

**Universidad Pública de Navarra**

***Nafarroako Unibertsitate Publikoa***

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN***

**DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA***

***INFLUENCIA DE LA PROPORCIÓN DE FRUTA EN EL COLOR,  
COMPOSICIÓN FENÓLICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE VINOS DE  
MORA Y MANZANA DE ECUADOR.***

**MÁSTER EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD EN LAS INDUSTRIAS  
AGROALIMENTARIAS**

**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA**

**SARA SALVATIERRA ZUBIRI**

Pamplona, Junio 2011

**Dirigido por:**

**Dr. Íñigo Arozarena Martinicorena**

## **VºBº del Director del TFM**

Iñigo Arozarena Martinicorena, profesor del departamento de Tecnología de Alimentos de la UPNA, autoriza a Sara Salvatierra Zubiri la presentación de su Trabajo Fin de Máster, que lleva por título “influencia de la proporción de fruta en el color, composición fenólica y actividad antioxidante de vinos de mora y manzana de Ecuador”.

En Pamplona, a 24 de junio de 2011

Fdo. Iñigo Arozarena Martinicorena

## **RESUMEN**

Este trabajo se presenta como continuación a los estudios realizados en 2010 en el marco de un proyecto de cooperación entre la Universidad Pública de Navarra y la Universidad Técnica de Ambato (Ecuador), caracterización del color, composición fenólica y actividad antioxidante de vinos de Mora Andina (*Rubus glaucus*) bajo distintas condiciones de elaboración. En esta ocasión se estudia la influencia de la concentración de fruta en dichos parámetros en vinos elaborados con mora, y en vinos elaborados con mora y manzana (variedad Emilia, *Malus communis* - Reineta Amarilla de Blenheim).

El objetivo de este trabajo es conocer la influencia de diferentes proporciones de Mora Andina en los parámetros de color, composición fenólica y actividad antioxidante de los vinos elaborados, así como el comportamiento de los mismos añadiendo una nueva fruta, la manzana. Unido a esto se valoró la correlación existente entre los distintos parámetros estudiados, especialmente entre la capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos.

Para ello se han estudiado 24 vinos, divididos en dos series correspondientes a dos diseños experimentales: vinos de mora obtenidos con tres proporciones de fruta y agua, y vinos de mora y manzana con tres proporciones distintas de cada tipo de fruta.

Para la caracterización del color se analizan diferentes parámetros, como la absorbancia a 420 nm, 520 nm y 620 nm, la intensidad colorante y la tonalidad, así como el color de los pigmentos sensibles (antocianos libres) y resistentes a la decoloración mediante SO<sub>2</sub>, y la edad química del vino. Para la determinación de polifenoles totales se utiliza el índice de Folin-Ciocalteu, mientras que la capacidad antioxidante se analiza mediante el método DPPH. Por último la caracterización y concentración de antocianos y elagitaninos se lleva a cabo mediante HPLC. Se observó que el contenido en polifenoles, especialmente el de elagitaninos aumenta con el contenido de mora en los vinos, así como su capacidad antioxidante, obteniéndose vinos más evolucionados en su color. Este efecto fue más acusado en el caso de los vinos de mezcla debido, probablemente a la influencia de la manzana. Existe una importante relación entre la capacidad antioxidante de los vinos y los polifenoles, principalmente con los elagitaninos.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a mi tutor Iñigo Arozarena toda la paciencia, interés y apoyo durante los últimos meses, especialmente estos últimos días por su tiempo y la gran ayuda que me ha ofrecido en la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Gabriel por estar siempre disponible para ayudarme y por su paciencia.

No puedo olvidarme de Iván, por su gran ayuda en el laboratorio durante su estancia en España.

A mis compis de máster, por estos meses tan estupendos juntos, cenas post-infierno y demás, por hacer las clases más llevaderas y el apoyo mutuos.

A mi familia, por soportar los días de agobios, por su apoyo incondicional y permitirme hacer este Máster.

Y por último, aunque no por eso menos importante, a mis chicas, por conseguir sacar siempre el lado positivo a todo.

Gracias a todos.

# **ÍNDICE GENERAL**

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
1.1 Introducción .....	10
<b>CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES .....</b>	<b>12</b>
2.1 Localización del proyecto.....	13
2.2 Mora de Castilla .....	15
2.3 Manzana Emilia .....	17
2.4 Vinos de frutas .....	19
2.5 Compuestos fenólicos.....	23
2.5.1 Antocianos.....	26
2.5.2 Elagitaninos .....	27
<b>CAPÍTULO 3: OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO 4: MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
4.1 Diseño experimental. Elaboración de los vinos .....	31
4.2 Métodos analíticos.....	35
4.2.1 Medidas de color y composición fenólica global .....	35
4.2.1.1 Intensidad colorante, tonalidad y parámetros relacionados .....	35
4.2.1.2 Color del vino, color de los pigmentos resistentes a la decoloración por SO <sub>2</sub> color de los antocianos libres, edad química del vino.....	36
4.2.1.3 <i>Contenido total en antocianos monoméricos (o libres)</i> .....	37
4.2.1.4 <i>Polifenoles totales – Índice de Folin-Ciocalteu</i> .....	39
4.2.1.5 <i>Índice de polifenoles totales – IPT</i> .....	40
4.2.2 Determinación de la actividad antioxidante en vinos (método DPPH) .....	41
4.2.3 Determinación de antocianos mediante HPLC .....	42
4.2.4 Determinación de elagitaninos mediante HPLC .....	43
4.2.4.1 Método de hidrólisis.....	44
4.2.4.2 Método HPLC.....	45
4.3 Tratamientos estadísticos .....	45
<b>CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
5.1 Composición fenólica global .....	47
5.1.1. Vinos de mora.....	47
5.1.2. Vinos de mezcla.....	49

5.2 Antocianos .....	53
5.2.1. Vinos de mora.....	53
5.2.2. Vinos de mezcla .....	57
5.3 Elagitaninos.....	58
5.3.1. Vinos de mora.....	58
5.3.2. Vinos de mezcla.....	61
5.4 Relación entre variables.....	61
5.4.1. Vinos de mora.....	61
5.4.2. Vinos de mezcla.....	64
<b>CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES .....</b>	<b>65</b>
<b>CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>68</b>
<b>CAPÍTULO 8: ANEXOS.....</b>	<b>72</b>

## **ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1: Ejemplos de vinos de frutas para la elaboración de vinos presentes en la literatura científica. ....	20
Tabla 2: Especificaciones de los vinos de frutas (Norma INEN- 374).....	22
Tabla 3: Diseño de experimentos del estudio 1 .....	32
Tabla 4: Diseño de experimentos del estudio 2.....	32
Tabla 5: Gradiente utilizado para la de terminación de antocianos mediante HPLC ....	42
Tabla 6: Gradiente utilizado para la de terminación de antocianos mediante HPLC ....	45
Tabla 7: Parámetros de color (A420, A520, A620, IC y T) de los vinos de mora según la concentración de fruta empleada en la elaboración .....	48
Tabla 8: Parámetros de color (WC, PPC, AC, CAW) de los vinos de mora según la concentración de fruta empleada en la elaboración .....	48
Tabla 9: Composición fenólica global (AT, IPT, PT) y actividad antioxidante (AA) de los vinos de mora según la concentración de fruta empleada en la elaboración.....	49
Tabla 10: Proporción final mora: manzana: agua de los vinos de mezcla .....	50
Tabla 11: Parámetros de color (A420, A520, A620, IC y T) de los vinos de mezcla según la concentración de fruta empleada en la elaboración .....	51
Tabla 12: Parámetros de color (WC, PPC, AC, CAW) de los vinos de mezcla según la concentración de fruta empleada en la elaboración .....	52

Tabla 13: Composición fenólica global (AT, IPT, PT) y actividad antioxidante (AA) de los vinos de mezcla según la concentración de fruta empleada en la elaboración ....	52
Tabla 14: Grupos de antocianos generados por su elevada correlación .....	54
Tabla 15: Antocianos obtenidos mediante HPLC de los vinos de mora con las distintas proporciones .....	57
Tabla 16: Antocianos obtenidos mediante HPLC de los vinos de mezcla con las distintas proporciones .....	57
Tabla 17: Elagitaninos obtenidos mediante HPLC de los vinos de mora con las distintas proporciones .....	61
Tabla 18: Elagitaninos obtenidos mediante HPLC de los vinos de mezcla con las distintas proporciones .....	61
Tabla 19: Matriz de correlaciones de Pearson para los vinos de mora .....	62
Tabla 20: Matriz de correlaciones de Pearson para los vinos de mezcla .....	64
Tabla A1.1: Parámetros de color ( $A_{420}$ , $A_{520}$ , $A_{620}$ , IC y T) de los vinos de mora .....	73
Tabla A1.2: Parámetros de color (WC, $CD_{SO_2}$ , AC, CAW) de los vinos de mora .....	73
Tabla A1.3: Composición fenólica (AT, PT, IPT) y actividad antioxidante (AA) de los vinos de mora. ....	74
Tabla A1.4: Contenido en antocianos mediante HPLC de los vinos de mora (mg/l) .....	74
Tabla A1.5: Contenido en elagitaninos (EL) y ácido elágico (AE) de los vinos de mora (mg/l) .....	75
Tabla A1.6: Parámetros de color ( $A_{420}$ , $A_{520}$ , $A_{620}$ , IC y T) de los vinos de mezcla .....	75
Tabla A1.7: Parámetros de color (WC, $CD_{SO_2}$ , AC, CAW) de los vinos de mezcla .....	76
Tabla A1.8: Composición fenólica (AT, PT, IPT) y actividad antioxidante (AA) de los vinos de mezcla .....	76
Tabla A1.9: Contenido en antocianos mediante HPLC de los vinos de mezcla (mg/l) ..	77
Tabla A1.10: Contenido en elagitaninos (EL) y ácido elágico (AE) de los vinos de mezcla (mg/l) .....	77
Tabla A3.1. Correlaciones entre los picos antocianos vinos de mora .....	81
Tabla A3.2. Correlaciones picos antocianos vinos de mezcla .....	81

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1: Localización de la provincia de Tungurahua en Ecuador .....	13
Figura 2: Mora de Castilla.....	15
Figura 3: Distribución de la producción de frutas en Ecuador por provincias .....	16
Figura 4: Vino de mora y vino de fresa elaborados en la bodega <i>Chateau Renaissance</i> Nueva York (E.E.U.U.) e imagen de vino de frambuesa de la bodega <i>Cairn O'Mohr</i> en Escocia.....	21
Figura 5: Estructura química de los principales compuestos fenólicos en la Mora Andina ( <i>Rubus glaucus</i> ).....	25
Figura 6: Estructura química de los principales antocianos presentes en la Mora Andina ( <i>Rubus glaucus</i> ).....	27
Figura 7: Estructura química del ácido elágico .....	28
Figura 8: Diagrama de flujo de elaboración de los vinos de frutas. ....	33
Figura 9: Proceso elaboración de la recta patrón ácido gálico. Inicio .....	40
Figura 10: Proceso de elaboración de la recta patrón ácido gálico. Transcurridos 30 minutos.....	40
Figura 11: Representación esquemática de la hidrólisis ácida de los elagitaninos de <i>Rubus spp.</i> ....	43
Figura 12: Dispositivo para la hidrólisis de los elagitaninos.....	44
Figura 13: Cromatograma a 520 nm de un vino de mora.....	53
Figura 14: Espectros de absorción de los picos encontrados .....	55
Figura 15: Cromatogramas antes y tras la hidrólisis de elagitaninos de un vino de mora (254 nm) .....	59
Figura 16: Espectros de absorción de los principales compuestos resultantes de la hidrólisis de los elagitaninos .....	60

## **ÍNDICE DE GRÁFICOS**

Gráfico A2.1: Recta patrón ácido gálico.....	78
Gráfico A2.2: Recta patrón DPPH.....	78
Gráfico A2.3: Recta patrón del monoglucósido de cianidina .....	79
Gráfico A2.4: Recta patrón del rutinósido de cianidina.....	79
Gráfico 5: Recta patrón del ácido elágico .....	80



***1. INTRODUCCIÓN***

## 1.1. INTRODUCCIÓN

El vino elaborado a partir de uva es probablemente la bebida de fruta fermentada más extendida a lo largo del planeta. Sin embargo, hay zonas, sobretodo tropicales, en las que, debido a su climatología, les dificulta o imposibilita el cultivo de la vid (*Vitis vinífera*), y en cambio, les permite la producción de otras frutas fermentables.

Los vinos de frutas son una alternativa viable para el desarrollo agroindustrial, ya que dan un valor añadido a la fruta, y abren un nuevo mercado aumentando los beneficios económicos. Además, la elaboración de vinos a partir de jugos de frutas garantiza la estabilidad del producto a temperatura ambiente reduciendo costes (Cassano et al, 2003).

En los últimos años, se ha incrementado el interés por los estudios de plantas con derivados fenólicos, debido principalmente a su estrecha relación con propiedades beneficiosas para la salud y a su elevado poder antioxidante. La mora es una fruta rica en estos compuestos, especialmente en elagitaninos y antocianos. Por lo que tanto la mora y los productos derivados de ella, como el vino, son alimentos con una elevada capacidad antioxidante (Mertz et al., 2009).

Existen numerosos productos alimentarios que no han sido químicamente analizados y pese a su posible potencial no dejan de ser productos locales que no traspasan fronteras. Es el caso de los vinos de mora y en concreto de la especie *Rubus glaucus* (denominada comúnmente *Mora Andina* o *Mora de Castilla*). Se trata de una especie de peculiares características químicas y organolépticas que las diferencian de otras moras, típica de zonas andinas tropicales. Tanto la fruta, como especialmente el vino elaborado con ella es desconocido en nuestro país.

Este proyecto se encuentra dentro de la investigación sobre “mejora de la producción de vinos de frutas de Ecuador” financiado por la Agencia Española de Cooperación Internacional al Desarrollo (AECID) dentro del Programa de Cooperación Interuniversitaria e Investigación Científica con Iberoamérica (PCI-Iberoamérica).

Por lo que, además del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Pública de Navarra (UPNA), participan, por parte de Ecuador, la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos (FCIAL) de la Universidad Técnica de Ambato (UTA), y la Asociación de Mujeres Trabajadoras “Alborada” (ASOMA), ambos localizados en la provincia de Tungurahua, donde existe una pequeña producción de vinos de diferentes frutas, en particular de mora.

El proyecto tiene como finalidad, tanto la cooperación con la ASOMA y la UTA, para la potenciación y la optimización de su producción de vinos, desde un punto de vista tecnológico, como la obtención de nuevos datos y ampliar su conocimiento, en concreto la caracterización de su color y composición fenólica de los vinos de mora y de la mezcla de mora y manzana. Este segundo punto se describe en el presente documento.

## **2. ANTECEDENTES**

## 2.1. Localización del proyecto

Los vinos proceden de la República de Ecuador (donde han sido elaborados), y más concretamente de la provincia de Tungurahua (Figura 1) situada en la Sierra de Ecuador, en el centro de la región andina.

La provincia de Tungurahua, cuya capital provincial es Ambato, tiene una extensión de 3.334 km<sup>2</sup> de superficie. Presenta panoramas muy desiguales en su topografía, debido a esto se ha creado una gran diversificación de suelos ricos para la agricultura, donde los principales cultivos son los tubérculos, raíces, hortalizas y frutas. Es una zona de elevada influencia volcánica debido a que en ella se encuentra el volcán Tungurahua (5.027m) activo desde 1999.

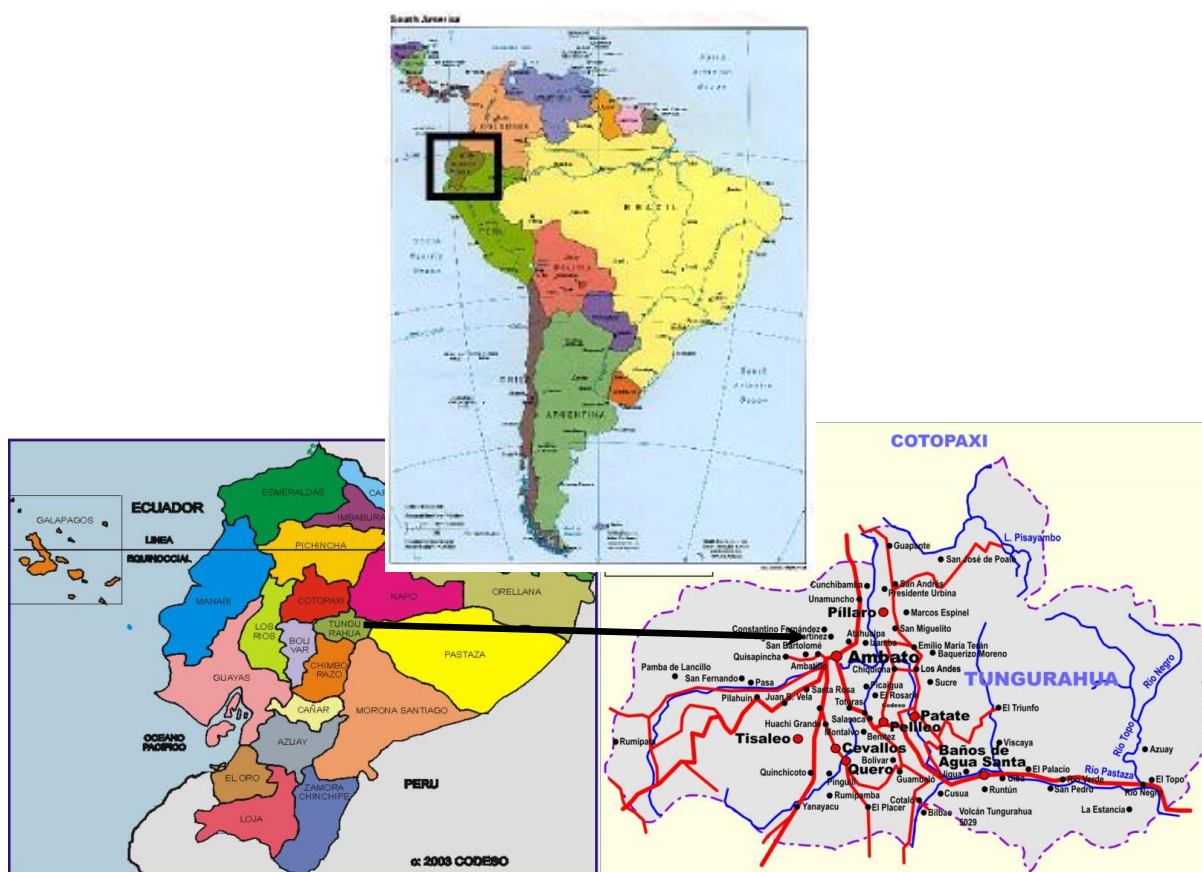


Figura 1: Localización de la provincia de Tungurahua en Ecuador

En esta provincia, la tasa de crecimiento poblacional en el sector rural es del 1,9%, esto muestra que hay una tendencia de crecimiento de la población urbana causada por el alto índice de natalidad y por la migración campo-ciudad, pese a que un buen porcentaje de los habitantes se encuentra en el sector rural (57,3%).

El clima de la zona es en general templado y seco, aunque existen pequeñas zonas con características climáticas propias. La temperatura ambiente promedio es de 15 °C, la humedad es baja y la precipitación pluviométrica oscila entre 470 y 1000 mm. Las principales lluvias se dan entre septiembre y diciembre, siendo aprovechadas para el cultivo de frutales.

La agricultura es la principal actividad económica de la zona, concentrado al 40% de la población activa y cerca del 50% de la tierra tiene como destino la actividad agropecuaria.

La provincia de Tungurahua produce alrededor del 40% de la mora y del 50% de la manzana de Ecuador. La “Mora de Castilla” es característica de regiones andinas tropicales, mientras que la manzana “Emilia” es una variedad tradicional en la zona. Su producción y calidad han caído en los últimos años debido al efecto de las cenizas que periódicamente desprende el volcán Tungurahua. La producción de vinos puede ser una de las posibles alternativas para hacer más sostenible su cultivo.

## 2.2.Mora de Castilla

Existen más de 3.500 especies del género *Rubus*, dentro de ellos se encuentra la mora de castilla (*Rubus glaucus*). Se trata de un arbusto trepador perenne perteneciente a la familia de las rosáceas y originaria de la zona norte de los Andes (Schreckinger *et al.*, 2010). Se encuentra en áreas de elevada altitud (1200-3000 m sobre el nivel del mar) como Ecuador, Colombia, Panamá y Méjico.



mora de Castilla

**Figura 2: Mora de Castilla**  
(National Research Council, 1989).

Las rosáceas incluyen frutas importantes económicamente como la fresa, frambuesa, manzana, ciruela y pera entre otras (Vasco *et al.*, 2009).

Aunque es muy común de forma salvaje, también se cultiva en los jardines de ciertas ciudades y pueblos, especialmente en Ecuador y Colombia. En los últimos años, ha aumentado su cultivo por ser rentable y porque ha comenzado la exportación de estas frutas (National Research Council, 1989). Aunque

esta fruta es muy común en los mercados andinos, es poco conocida en otros lugares.

Cuando está totalmente madura, van de color rojo oscuro a casi negro. Sus semillas son pequeñas, y duras, con poca carne adherida. En sabor son más bien ácidas haciéndolas apropiadas para comer en fresco, pero también para su uso en zumos, mermeladas y conservas. Tiene un zumo de elevada calidad, de un color llamativo púrpura rojizo, de sabor similar al de las frambuesas negras.



Las bayas son muy perecederas, por lo tanto requiere de especiales cuidados durante la cosecha y el manejo post cosecha (Collado *et al.*, 2001). Debido a la fragilidad de esta fruta, es principalmente procesada (mermeladas, jaleas, jugos, vino...). De hecho, se habla de pérdidas de un 30% de la cosecha debido a dificultades en la conservación y a la elevada alterabilidad de esta fruta (Garzón *et al.*, 2009).

Su productividad varía ampliamente entre regiones y también entre explotaciones. Además se cultiva durante todo el año, variando su rendimiento, siendo la temporada de mayor producción durante el invierno (Vasco et al 2009). La planta crece mejor a temperaturas que varían entre 12 y 19 °C, con humedad relativa del 80 al 90%, alto brillo solar y precipitaciones entre 800 y 2.500 mm al año, bien distribuidas.

En Ecuador, la mora es una fruta de consumo diario en la mayoría de las familias por lo que su demanda alcanza los 2 kg/ familia. La superficie cultivada en el país llega a las 5.247 hectáreas y en su mayor parte por productores pequeños y medianos que van desde las 200 a las 2000 plantas en producción (Agencia de Noticias para la Difusión de la Ciencia y la Tecnología, DiCYT).

La producción de mora es mayor en la zona centro del país (figura 3) (provincias de Bolívar, Cotopaxi y Tungurahua). Tungurahua es la principal zona productora del país, un 90% de la mora cultivada es de la variedad *Rubus glaucus*.

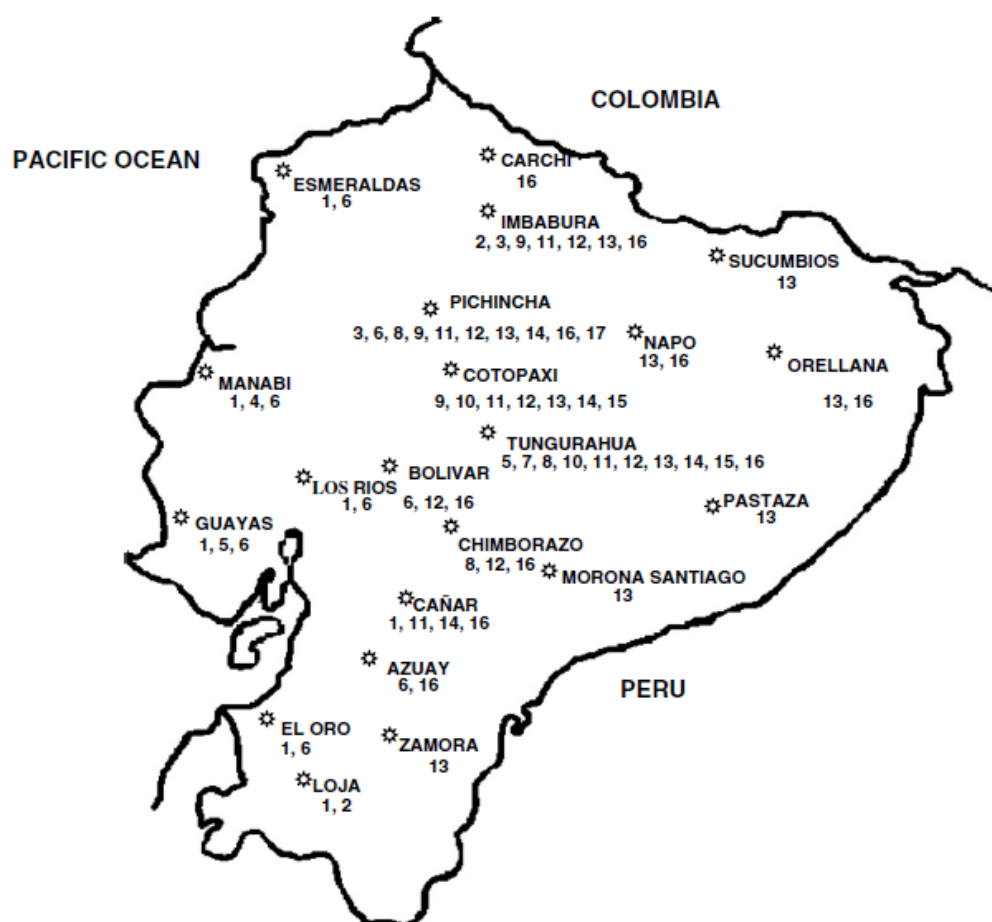


Figura 3: Distribución de la producción de frutas en Ecuador por provincias. La mora andina corresponde al número 12. (Vasco et al, 2008).



Además de sus cualidades organolépticas y productivas, la Mora de Castilla es una importante fuente de polifenoles, compuestos de gran interés por su capacidad antioxidante contra los radicales libres y sus posibles propiedades beneficiosas para la salud, como la reducción de riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares así como diversas patologías relacionadas (Mertz *et al*, 2007).

Diversos estudios han demostrado la importancia de los beneficios de las frutas rojas en la dieta relacionadas con la prevención de enfermedades coronarias, infartos de corazón, cáncer, diabetes y derrames cerebrales entre otras. Estos beneficios se derivan del elevado contenido en vitaminas y compuestos fenólicos de la mayor parte de estas frutas. La composición química de las frutas rojas varía dependiendo de la especie, área de producción, estado de maduración y condiciones de almacenamiento (Howard *et al*, 2007).

En concreto, la especie *Rubus glaucus* ha sido estudiada en los últimos años por diversos autores (Vasco *et al*, 2008 y 2009, Garzón *et al*, 2009, Mertz *et al*, 2007, Vrhovsek *et al*, 2006, Ramos *et al*, 2005 y Gomez, *et al*, 2005) con el objetivo de conocer su composición, sus propiedades y su comportamiento. Se sabe de su elevada contenido en polifenoles (2167 mg GAE/ 100 g FW) muy superior a otras frutas como la fresa, el mango o la ciruela, aunque hay que tener en cuenta su amplia variabilidad entre la cosecha, el clima, la madurez así como el método de análisis. También destaca por su capacidad antioxidante, su contenido en antocianos y en elagitaninos (Koca *et al*., 2009, Mertz *et al*., 2007, Vasco *et al*., 2009, Vrhovsek *et al*., 2006). Se trata de un alimento con elevada acidez, pH bajo (2,9- 3,1) y °Brix entre 9 y 12%.

### **2.3. Manzana Emilia**

La variedad Emilia, (como es conocida en Ecuador o por su nombre científico *Malus communis* - Reineta Amarilla de Blenheim) se trata de la principal variedad de manzana cultivada en Ecuador, suponiendo el 70-80 % del total de alrededor de 500 ha destinadas a este cultivo.

Las principales zonas de cultivo en Ecuador se encuentran en las regiones templadas altas de la sierra ecuatoriana, donde existen principalmente variedades de mediano-alto requerimiento de frío. Las áreas productoras más importantes están en las provincias de Carchi, Iambabura, Pichincha, Tungurahua, Azuay y Loja.

Existen varias limitaciones para el cultivo de esta fruta en el país, y el principal problema es la falta de frío, en la mayor parte de las regiones, que provoca escasez de floración, falta de brotación en todas las yemas y, en consecuencia, bajos rendimientos.

La manzana es consumida principalmente en fresco, sin embargo, también se elaboran productos con manzana como compotas, mermeladas, pasteles y de la fermentación de su jugo se obtiene la sidra.

Dentro de los componentes que aporta la manzana, los polifenoles poseen gran importancia, por su contenido y su composición, en la calidad sensorial de la fruta fresca y de los productos elaborados con ella. También son reconocidas por sus propiedades antioxidantes.

Sun *et al.* (2002) encontraron que las manzanas tenían el contenido más alto en fenólicos libres solubles en comparación con otras 10 frutas de consumo habitual. Vinson *et al.* (2001) midieron la capacidad antioxidante de 20 frutas, situándose la manzana en la posición 8 de las 20.

Según Marks *et al.* (2007) existen cinco clases principales de polifenoles en las manzanas; los flavan-3-oles, que incluyen el monómero (catequina) y formas poliméricas (procianidinas) constituídas por unidades de epicatequina, los ácidos hidroxycinámicos, las hidrocalconas, los flavanoles y las antocianinas presentes en la cáscara de las manzanas contribuyendo al color de las variedades de rojas.

Algunos polifenoles, como los ácidos hidroxycinámicos son precursores de compuestos volátiles que contribuyen al aroma de sidra. Además, las procianidinas también están involucrados en el pardeamiento enzimático y en particular su grado de polimerización es el responsable de la amargura y la astringencia de la sidra de manzana jugos y sidras (Khanizadeh *et al.*, 2008) pudiendo ocurrir procesos similares en el caso de vinos elaborados con esta fruta.

## **2.4.Vinos de frutas**

A pesar de ser los vinos de uva los más comercializados, seguidos a distancia de la sidra, en diversas regiones del mundo, sobre todo en las zonas más alejadas de latitudes templadas, donde resulta imposible el cultivo de la vid, se encuentran producciones de vinos elaborados con frutas.

Estos vinos, resultan una buena oportunidad para el desarrollo agroindustrial de estos países, puesto que le otorgan un valor añadido a frutas, que de no ser así son cosechas perdidas. La elaboración de vinos garantiza la estabilidad del producto a temperatura ambiente. Además son productos con elevada cantidad de compuestos polifenólicos por lo que parecen ser los ingredientes más apropiados para este fin, favoreciendo la elaboración de productos de calidad (Cassano et al, 2003).

Por ello se realizan investigaciones sobre todo en los aspectos que están relacionados con la posibilidad de mejorar o facilitar la elaboración de otros tipos de vinos elaborados con frutas tropicales (Petrova, 2002).

La pérdida de color, y el deterioro (pardeamiento) así como la formación de sedimentos durante el almacenamiento de los vinos de frutas son los principales problemas comerciales. Los principales responsables de estos efectos son los antocianos, los pigmentos rojos (Rommel, 1990).

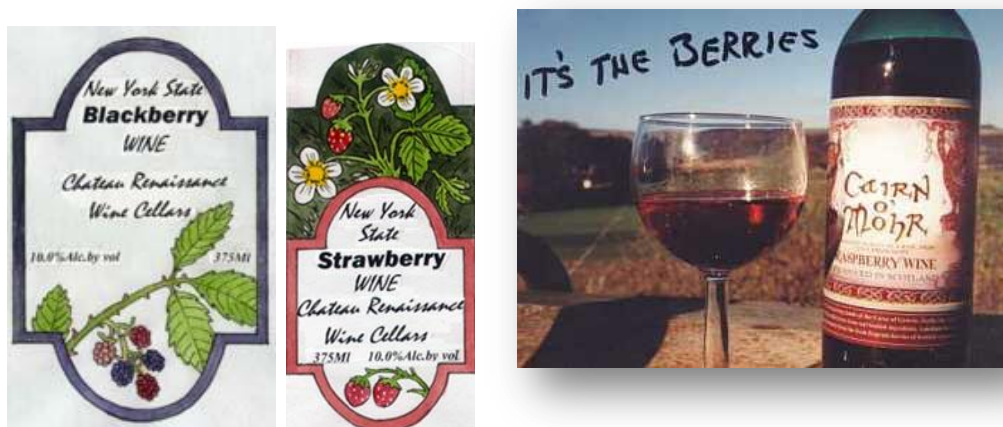
Se han encontrado numerosos ejemplos de vinos elaborados con frutas en zonas tropicales (Ecuador, Colombia, Sudáfrica, Brasil...), así como en zonas frías (Canadá, Alemania, Polonia...) (Tabla 1), e incluso comienzan a aparecer tímidamente en España.

**Tabla 1: Ejemplos de vinos de frutas para la elaboración de vinos presentes en la literatura científica**

Frutas	Origen geográfico	Nº referencias
Banana, plátano	Trinidad y Tobago (4), Nigeria(3), India y USA	9
Mango	Nigeria (3) e India	4
Fresa	India (2), Alemania y Turquía	4
Mora	Corea, Ecuador, Colombia	4
Arándano	Canadá, España y Taiwán	4
Naranja	Turquía (2), USA y España	4
Anacardo	Brasil, India y Nigeria	3
Marula	Sudáfrica (2) y Zimbawe	3
Zúrzalo	India (2) y Usa	3
Grosella	Canadá (2) y Polonia	3
Cereza	Canadá (2) y Polonia	3
Frambuesa	Canadá, Nueva Zelanda	3
Piña	Trinidad y Tobago y Nigeria	2
Carambola	Trinidad y Tobago y Taiwán	2
Jabuticaba	Brasil	2
Palma (savia)	Nigeria	2
Pera	USA e India	2
Mandarina	Turquía	1
Manzana	Ecuador	1

Algunos son simplemente experimentos de laboratorio llegando en un futuro próximo probablemente al mercado, pero otros ya se encuentran a la venta, siendo habitual y exitosa su comercialización.

Como ejemplo se encuentran los vinos de frutas (mora, fresa, frambuesa, melocotón, cereza...) elaborados en el estado de Nueva York (E.E.U.U.) en la bodega *Chateau Renaissance* , o los similares de la bodega *Cairn O'Mohr* en Escocia (Figura 4)



**Figura 4:** Imagen de vino de mora y vino de fresa elaborados en la bodega *Chateau Renaissance* Nueva York (E.E.U.U.) e imagen de vino de frambuesa de la bodega *Cairn O'Mohr* en Escocia

Centrándonos en los dos países a los que pertenecen este estudio, también se han encontrado ejemplos de vinos elaborados en similares circunstancias.

En Ecuador se han estudiado vinos de frutas con anterioridad, entre otros, vinos de mora, vino de jícama y manzana y vino de naranja, los tres elaborados en similares condiciones que el del presente trabajo. Esto nos indica la importancia de los vinos de frutas en Ecuador para su economía.

En cuanto a España, una tesis doctoral publicada en 2006, estudió la posibilidad de elaborar vinos mediante cítricos, en concreto de naranja. En la actualidad, una empresa valenciana los comercializa. Aún así en nuestro país no se encuentran demasiado aceptados por la población esta clase de bebidas, confundiéndolas en la mayoría de los casos con licores de frutas.

En Europa, la Asociación de la industria de la sidra y el vino de fruta de la Unión Europea (AICV) define estos vinos de la manera siguiente:

*“bebida alcohólica obtenida por fermentación completa o parcial del zumo de pulpa fresco, concentrado o reconstituido de fruta comestible (domésticas o tropicales), distintas a la uva, con o sin la adición de agua, azúcar o miel”.* (Graduación alcohólica: 8-14%).

En Ecuador, la Norma Ecuatoriana NTE-INEN-0374, define los vinos de frutas de la siguiente manera:

“el vino obtenido por fermentación alcohólica de mostos constituidos por jugos de frutas convenientemente corregidos en lo que se refiere a contenido de azúcar y acidez” (graduación alcohólica entre 8-18%)

Según esta norma, los vinos de frutas deben cumplir las siguientes especificaciones:

**Tabla 2: Especificaciones de los vinos de frutas (Norma Inen 374).**

<b>Requisitos</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Método de ensayo</b>
Grado alcohólico, a 20°C (°CL)	8	18	INEN 360
Acidez volátil, como ácido acético (g/l)	-	2.0	INEN 341
Acidez total, como ácido acético (g/l)	-	13.0	INEN 341
Extracto seco (g/l)	-	19	INEN 346
Metanol % (v/v)	-	0,02	INEN 347
Ceniza (g/l)	-	5.0	INEN 348
Cloruros, como cloruro de sodio (g/l)	-	1.0	INEN 353
Sulfatos, como sulfato de potasio (g/l)	-	2.0	INEN 354
Glicerina (g/l)	1	10	INEN 355
Anhídrido sulfuroso total (mg/l)	-	300	INEN 356
Anhídrido sulfuroso libre (mg/l)	-	40	INEN 357

**Fuente: Normas INEN AL 04.01-403**

Para la elaboración de los vinos de fruta es recomendable que la materia prima sea recolectada con unas características químicas, sanitarias y organolépticas adecuadas. La recolección de la fruta debe de hacerse en un adecuado estado de maduración, momento en el cual el fruto tiene un elevado contenido en azúcares y aromas. Otros factores que se deben de tener en cuenta a la hora de la recolección son el pH, el contenido en ácidos y la coloración del fruto. Todas estas variables condicionarán el transcurso de la fermentación y las características finales del vino.

La uva es la mejor materia prima para obtener vino en parte debido a que a partir de ella es sencillo obtener un mosto líquido y muy rico en azúcares. Otras muchas frutas, como la mora, no cuentan con una concentración en azúcares tan elevada como la uva. Además en muchos casos para obtener un mosto suficientemente fluido se hace casi imprescindible la adición de agua, lo que provoca una dilución adicional de la riqueza en azúcares del mosto.

Por lo tanto para obtener un vino con una graduación suficiente suele ser necesario añadir cantidades apreciables de azúcares, bien en forma de azúcar común, miel, jarabes de glucosa, etc. La normativa ecuatoriana contempla esta posibilidad.

Más allá de estas diferencias, el proceso de elaboración de los vinos de bayas es similar al de los vinos de uva, ya que la fruta es previamente prensada o triturada y el zumo prensado es fermentado en presencia de las partes sólidas de la fruta, para favorecer así que los compuestos fenólicos sean efectivamente extraídos en los vinos (Sanchez et al, 2003).

La pérdida de color, y el deterioro (pardeamiento) así como la formación de sedimentos durante el almacenamiento de los vinos de frutas son los principales problemas comerciales. Los principales responsables de estos efectos son los antocianos, los pigmentos rojos (Rommel, 1990).

Por último, señalar que en Ecuador la práctica totalidad de los vinos de frutas demandados son dulces. Es decir, son vinos a los que una vez finalizada la fermentación y clarificado el vino, se añade azúcar hasta contenidos en azúcar que suelen oscilar entre 9 y 15°Brix.

## **2.5. Compuestos fenólicos**

Los constituyentes fenólicos tienen una gran importancia enológica debido al papel que juegan tanto directa como indirectamente sobre la calidad de los vinos. Son el origen del color y de la astringencia, siendo esta última relacionada con la presencia concreta de taninos. Pero además, según su naturaleza, pueden tener interés nutricional y farmacológico (Flanzy, 2003).

Las frutas y los productos de frutas, junto con el té, el vino tinto, los cereales, el chocolate y las legumbres, son considerados las principales fuentes de polifenoles en la dieta. Las bayas son una fuente fundamental de este tipo de compuestos. Los principales encontrados son los taninos hidrolizables como los elagitaninos, y los antocianos, ácidos hidroxycinámicos, flavonoles y proantocianidinas encontrándose en pequeñas cantidades (Mertz et al, 2007).

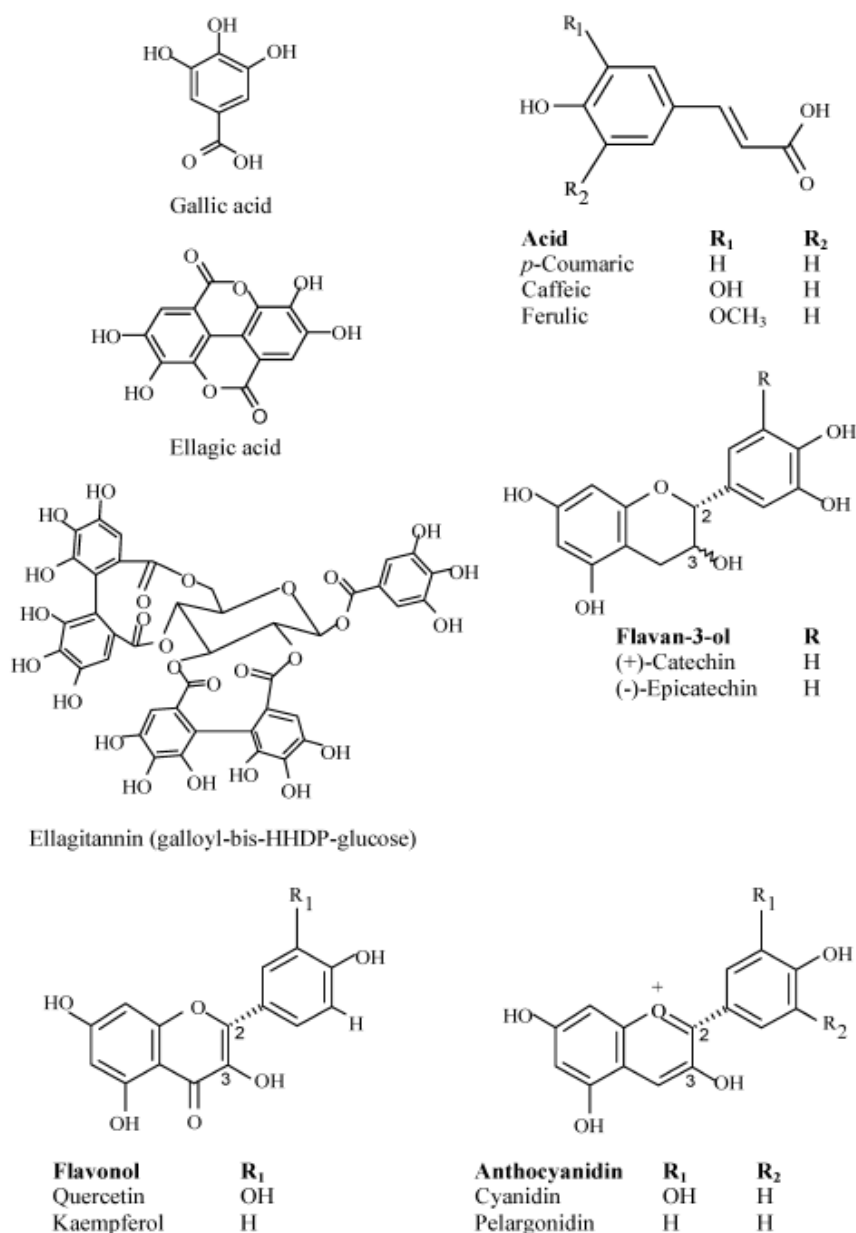
Según Howard et al. (2007) los compuestos fenólicos en las bayas se pueden clasificar en cinco grupos (figura 5):

- Ácidos fenólicos y sus derivados: siendo predominantes los ácidos hidroxibenzóicos y los ácidos hidroxicinámicos. Estos compuestos se encuentran en las vacuolas de forma soluble o en forma insoluble en la pared de las células.
- Elagitaninos, ácido elágico y sus derivados: se encuentran en las pepitas de la mora. son sustancias muy importantes a la hora de la elaboración de vinos a partir de moras.
- Antocianos: pigmentos insolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales aportando color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos. Al igual que los elagitaninos, estas son sustancias muy importantes a la hora de elaborar vinos a partir de frutas rojas.
- Flavonoles: son una clase de flavonoides que utilizan la estructura 3-hidroxiflavona. Se encuentran en la mayoría de las plantas superiores, principalmente como glicósidos (unidos al azúcar, especialmente glucosa), en las vacuolas del tejido epidérmico.
- Flavanoles: son compuestos muy importantes en la uva y aparecen en menor medida en frutas rojas como la mora. La condensación de los flavanoles monoméricos, como la catequina o epicatequina, dan lugar a compuestos oligoméricos y poliméricos conocidos como proantocianidinas o taninos condensados.

En la mora los principales polifenoles son los antocianos y los elagitaninos, que se detallarán de manera más amplia en apartados posteriores.

Según Howard *et al.* (2007) se han detectado concentraciones de antocianos en mora en un rango de 31 a 256 mg/ 100 g de fruta fresca. Comparado con los antocianos el contenido de proantocianidinas es mucho menor con concentraciones de 9 a 27 mg/100 g, en flavonoles de 4 a 30 mg / 100 g, en ácido elágico de 2 a 34 mg/ 100 g y ácidos fenólicos de 7 a 64 mg/ 100 g. La concentración de polifenoles puede alcanzar niveles de hasta 3926 mg/ 100 g (Vasco et al., 2009).





**Figura 5: Estructura química de los principales compuestos fenólicos en la Mora Andina (*Rubus glaucus*), Vasco et al, 2009.**

Los compuestos fenólicos de los productos de los vinos elaborados con uva y de los orujos dependen principalmente de las técnicas de procesado como la duración del contacto con la piel, el estrujado o el prensado. Por ejemplo, la mayor capacidad antioxidante de los vinos tintos en comparación con los vinos blancos es debida a un mayor contacto con los hollejos. Otros factores como el oxígeno, las enzimas o la temperatura, pueden influir en la composición fenólica y en la capacidad antioxidante. (Su, 2007).

En el caso de los vinos de mora ocurre algo similar, ya que la presencia o no de la pulpa durante la fermentación permite la obtención de vinos más ricos en elagitaninos, polifenoles totales y con mayor capacidad antioxidante (Urretavizcaya, 2010).

#### 2.5.1. Antocianos

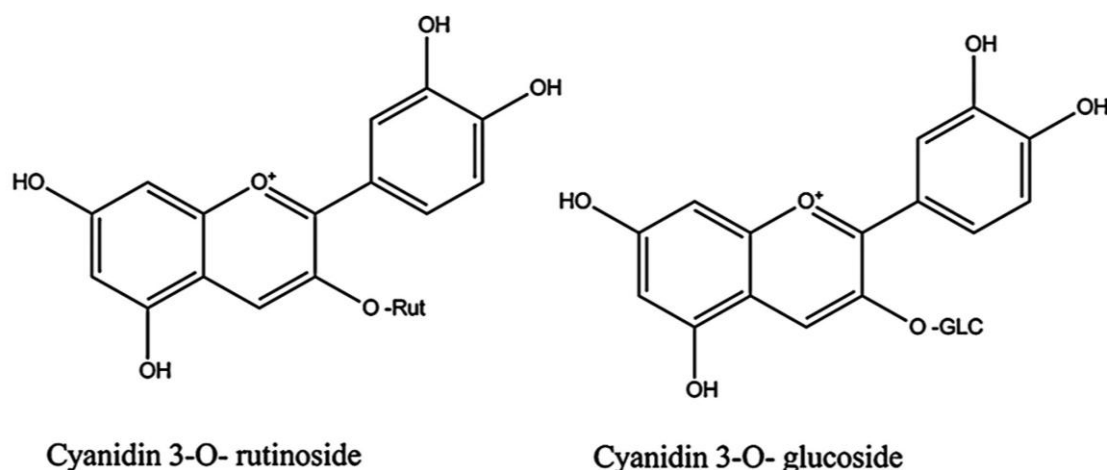
Los antocianos se encuentran ampliamente distribuidos entre frutas y vegetales. Siendo una de las principales clases de flavonoides solubles en agua. Son muy conocidos por su habilidad para aportar coloraciones rojas, azules y moradas a las plantas y las frutas rojas como son la uva tinta, fresas, moras, y arándanos entre otros. (Wu et al, 2005).

Químicamente son glucósidos fruto de la unión de antocianidinas y uno o más monosacáridos. Los azúcares que normalmente forman parte de las estructuras de los antocianos en las bayas son la glucosa, arabinosa, xilosa y la ramnosa. Los glucósidos pueden además estar acilados con ácidos como el acético, succínico, maloláctico y oxálico. Este tipo de reacciones amplían el rango de coloración de las frutas siendo útiles en ciertos caso para la detección de adulteraciones en jugos y vinos de frutas (Howard *et al.*, 2007).

Según Mertz *et al.* (2007) los antocianos son el segundo compuesto polifenólico que caracteriza a la especie *Rubus* después de los elagitaninos.

En la mora se han detectado predominantemente antocianos derivados de la cianidina unidos a varios azúcares (glucosa, arabinosa, rutinosa y xilosa). Los antocianos identificados se encuentran en un 94% de los casos sin acilar, en un 90% como monoglucósidos y en un 10% como diglucósidos (Howard *et al.*, 2007).

Los principales antocianos presentes en el género *Rubus* son el glucósido de cianidina y el rutinósido de cianidina (figura 6). Varios autores coinciden en las concentraciones de estos dos compuestos en la especie *Rubus glaucus*. Tanto Garzón *et al.* (2009) como Mertz *et al.* (2007) coinciden en una menor cantidad de glucósido de cianidina con proporciones de 40 y 30% del total de antocianos y mayor cantidad del rutinósido de cianidina con porcentajes entre 45% y 60%. Por el contrario Vasco *et al.* (2009) publicó que la composición del rutinósido de cianidina en esta especie es de un 30% frente a la de glucósido de cianidina que es de un 60%.



**Figura 6:** Estructura química de los principales antocianos presentes en la Mora Andina (*Rubus Glaucus*), Schreckinger *et al*, 2010.

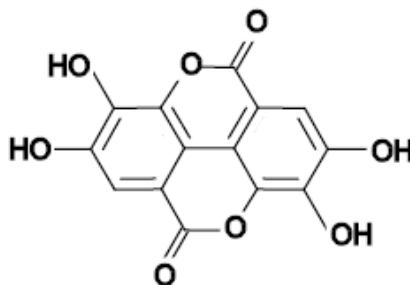
### 2.5.2. Elagitaninos

La presencia de elagitaninos en alimentos está limitada a algunas frutas como las fresas (*Fragaria x ananassa D.*), moras (*Rubus sp.*), frambuesas (*Rubus idaeus L.*) y uva variedad moscatel (*Vitis rotundifolia*).

Los elagitaninos son el principal grupo fenólico responsable de la astringencia y de las propiedades antioxidantes de las moras (Vrhovsek *et al.*, 2006). Los elagitaninos de *Rubus glaucus* son una mezcla compleja de taninos monoméricos y oligoméricos (ácido elágico, ácido gálico, sanguisorbol...).

Aunque los antocianos se encuentran en cantidades importantes en las moras, los elagitaninos son los principales compuestos fenólicos de estas frutas (Vrhovsek *et al.*, 2007) siendo estos los principales compuestos responsables de su actividad antioxidante.

Químicamente los elagitaninos son ésteres del ácido hexahidroxidifénico (ácido elágico) y sus derivados. El ácido elágico (figura 7) se forma por acoplamiento oxidativo de dos moléculas de ácido gálico. Tienen un elevado poder antioxidante. Son polifenoles de elevado peso molecular e insolubles en agua.



**Figura 7: Estructura química del ácido elágico**

Las frutas de baya contienen ácido elágico libre, acetilado y glucosilado. Debido a las diferentes uniones de estas moléculas se pueden encontrar distintos tipos de elagitaninos dependiendo del tipo de fruta.

En mora se han detectado concentraciones de hasta 1,2 a 3,0 mg/ 100 g de ácido elágico y 51,1 a 62,8 mg/100 g de elagitaninos. La mayor parte de los elagitaninos y ácido elágico se encuentran en las semillas (alrededor del 88%) mientras que el 12% restantes se encuentra en la pulpa (Howard et al., 2007).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1.Objetivo general**

El objetivo de este trabajo es continuar el trabajo iniciado en el año 2010 que persigue la caracterización del color, la composición fenólica y la capacidad antioxidante de vinos de frutas de mora andina (*Rubus glaucus*), en esta ocasión fermentados a partir de mostos preparados con diferentes proporciones de fruta y agua, así como mediante la mezcla con manzana en diversas proporciones.

#### **3.2.Objetivos particulares**

- Evaluar la influencia de la proporción de fruta/s en el color, la composición fenólica global e individualizada (antocianos y elagitaninos) y la actividad antioxidante de los vinos.
- Valorar la relación entre los distintos parámetros estudiados, especialmente entre la capacidad antioxidante y la composición fenólica, y entre los parámetros de color y la composición antocianica.

#### ***4. MATERIAL Y MÉTODOS***

#### 4.1.Diseño experimental. Elaboración de los vinos

Tanto los vinos de mora como los vinos de mezcla de mora y manzana se elaboraron en las instalaciones de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos (FCIAL) de la Universidad Técnica de Ambato (UTA), por dos alumnos de la facultad formando parte de sus trabajos de Tesis Fin de Grado.

Los vinos se elaboraron de manera similar al año anterior (Urretavizcaya, 2010), a pequeña escala (“microvinificaciones”) en depósitos de plástico de 20 litros de capacidad. El proceso de elaboración implicó la mezcla y trituración de las frutas con agua, el enriquecimiento del mosto con azúcar, la inoculación de levaduras, la adición de enzimas, la clarificación y el acabado final de los vinos mediante su endulzado y embotellado.

Para este trabajo se analizaron un total de 24 vinos de frutas, localizados en dos estudios independientes:

- **Estudio 1:** Se elaboraron 3 vinos a partir de mostos obtenidos con diferentes proporciones de mora y agua con cuatro repeticiones de cada uno, siendo por tanto 12 vinos en total. Las concentraciones de mora utilizadas (tabla 3) son la misma que la utilizada el año pasado así como dos más diluidas.
- **Estudio 2:** Se elaboraron 3 vinos mediante la mezcla de mora y manzana, de nuevo con 4 repeticiones para cada combinación. Las proporciones previstas se muestran en la tabla (tabla 4) manteniéndose constante la proporción de agua con respecto a la fruta total en todos ellos (2 partes de agua por cada parte de fruta total). Sin embargo, debido a un error en cálculo previo a la elaboración, la composición final de la mezcla intermedia a2 fue distinta a la prevista: 1 parte de mora, 1 parte de manzana y 2 partes (en vez de 4) de agua. De modo que este vino pasó a ser el de menor proporción de agua (50%) así como el de mayor proporción de cada una de las frutas por separado (25%).

**Tabla 3: Diseño de experimentos del estudio 1**

Factor A	Partes de mora	Partes de agua
a1	1 (20%)	4 (80%)
a2	1 (25%)	3 (75%)
a3	1 (33 %)	2 (67%)

**Tabla 4: Diseño de experimentos del estudio 2**

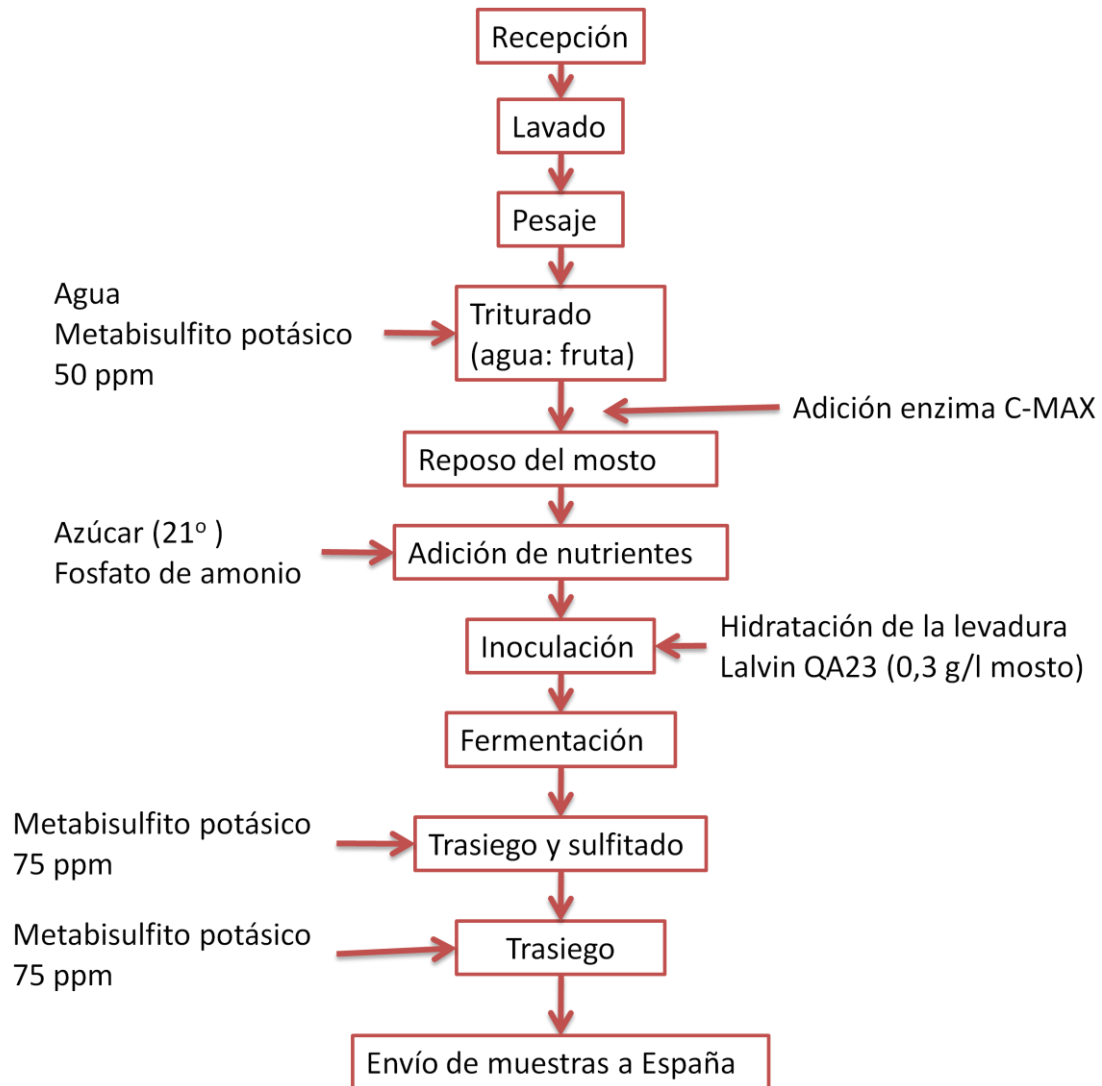
Factor A	Partes de mora	Partes de manzana	Partes de agua
a1	1 (11%)	2 (22%)	6 (67%)
a2 (previsto)	1 (16.5%)	1 (16.5%)	4 (67%)
a2 (real)	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)
a3	2 (22%)	1 (11%)	6 (67%)

En la elaboración de los vinos, como el primer año, se utilizaron de nuevo levaduras vínicas y enzimas pero sin ser un factor de estudio. Todas fermentaciones se realizaron con la levadura LALVIN QA23 (Lallemand), puesto que obtuvo las mejores valoraciones sensoriales en el estudio anterior tanto en mora como en manzana, además de tener el mejor comportamiento fermentativo.

En el caso de los vinos que contienen manzana se añadieron enzimas pectolíticas (C-MAX, Lallemand) tras de la fermentación para facilitar su clarificación en cantidades proporcionales a la cantidad de fruta de cada ensayo. En los vinos elaborados exclusivamente con mora, no se añadieron enzimas, puesto que la clarificación de los mismos se realiza de forma natural.

En la siguiente figura (figura 8) se muestra el diagrama de flujo seguido para la elaboración de los vinos.





**Figura 8: diagrama de flujo de elaboración de los vinos de frutas.**

A continuación se detallan las distintas etapas del proceso de elaboración:

**Recepción:** se seleccionan aquellas partidas de mora con una madurez y sanidad adecuada, mezclando distintas partidas de fruta para que de este modo en cada estudio la materia prima fuese lo más homogénea posible.

**Lavado:** ligeramente para eliminar partículas extrañas (tierra, hojas, etc).

**Pesado:** la fruta se pesó en una balanza para determinar la cantidad de materia prima a utilizar en el proceso.

**Adición de agua, triturado y sulfitado:** mediante una licuadora se trituró la fruta mezclada con agua, para obtener un mosto fluído y disminuir su elevada acidez característica de esta fruta ( $\text{pH} = 2,8\text{-}3,0$ , acidez total=  $1,9\text{-}2,2\%$  expresada como ácido málico).

En el momento del triturado se añadió una dosis de 50 ppm de Metabisulfito potásico para inactivar los posibles procesos oxidativos posteriores e inhibir el desarrollo de microorganismos (especialmente bacterias) y favorecer así el inicio de la fermentación alcohólica de la levadura añadida al día siguiente.

**Adición de enzimas pectinolíticas:** para la elaboración de vinos de mezcla. Se adicionó enzimas pectinolíticas C-MAX, para facilitar la clarificación de los vinos de manera previa a la fermentación, en concentraciones proporcional a la cantidad de fruta de cada ensayo (0.03 gramos por kg de manzana).

**Reposo:** se dejó reposar el mosto durante 24 horas a temperatura ambiente para permitir que el metabisulfito actuara.

**Adición de nutrientes:** se ajustó la concentración de los mostos a la misma concentración de azúcar ( $21^\circ \text{Briz}$ ) con la adición de azúcar de caña y se enriquecieron en nutrientes nitrogenados mediante la adición de 100 ppm de fosfato de amonio.

**Inoculación:** en esta etapa se adicionaron la levadura vínica LALVIN QA23 en una concentración de 0,3 g/ L de mosto. Antes de su adición se hidrató la levadura para su activación según las recomendaciones de las fichas técnicas. Para cada estudio el proceso de activación se realizó en un solo lote y se repartió después en parte iguales en los depósitos correspondientes para garantizar las mismas condiciones de partida.

**Fermentación:** para iniciar este proceso se taparon los recipientes de plástico dejando un espacio de cabeza de unos 10 cm de altura. En las tapas se realizaron dos pequeñas aperturas, una para permitir la salida del  $\text{CO}_2$  formado y otra en la que se colocó un tubo de plástico para la toma de muestras.

La toma de muestras se realizó diariamente para evaluar la conversión de azúcares en alcohol y dióxido de carbono, dándolo por finalizado cuando los grados Brix del mosto se estabilizaron.

**Trasiego y sulfitado:** una vez finalizada la fermentación, los vinos se trasegaron a nuevos depósitos, momento que se aprovechó para añadir una dosis de 75 ppm de Metabisulfito potásico, con el fin de evitar la proliferación de bacterias lácticas y acéticas, y prevenir la oxidación del vino.

**Envío de muestras a España:** una vez finalizadas las etapas ya mencionadas, se enviaron muestras de los vinos a la UPNA. Los vinos analizados en este trabajo son vinos secos, sin acabar, continuando después el proceso de elaboración con el endulzado y el embotellado de los vinos en las instalaciones de la UTA sin ser el objeto de este estudio.

## 4.2. Métodos analíticos

Los métodos analíticos llevados a cabo para el análisis de los vinos se pueden clasificar dentro de tres grandes grupos señalados a continuación:

- ✓ Medidas de color y de composición fenólica global.
- ✓ Determinación de la actividad antioxidante en vinos (método DPPH).
- ✓ Determinación de antocianos mediante HPLC.
- ✓ Determinación de elagitaninos mediante HPLC.

### 4.2.1. Medidas de color y composición fenólica global

Para la determinación del color y la composición fenólica de los vinos se han seguido diversos métodos de cuantificación. Todas ellas requieren el uso de un espectrofotómetro (en el rango del visible en casi todos los casos). Algunos son medidas directas, mientras que otras requieren un tratamiento previo de la muestra con determinados reactivos. Todos ellos se detallan a continuación.

#### 4.2.1.1. *Intensidad colorante, tonalidad y parámetros relacionados*

Procedimiento:

En este caso los parámetros se obtuvieron a partir de medidas directas de absorbancia de los vinos a longitudes de onda de 420, 520 y 620 nm. Las lecturas se realizaron en cubetas de vidrio óptico de 2 mm de paso, en un espectrofotómetro VIS V de doble haz

Zuzi Tu 1901. A partir de ellas y tras multiplicar las lecturas por cinco (para obtener la absorbancia correspondiente a 1 cm de paso) se obtuvieron los siguientes parámetros relacionados con el color del vino.

**Intensidad colorante (IC):** se obtiene a partir de la suma de la absorbancia de las tres longitudes de onda (Reglamento CEE N° 2676/90):

$$\text{IC: } A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

**Tonalidad (T):** cociente entre la absorbancia relativa a color amarillo y la relacionada con el color rojo (Reglamento CEE N° 2676/90):

$$\text{T} = (A_{420} / A_{520})$$

La composición del color, es decir, las contribuciones del color amarillo, rojo y azul a la intensidad colorante se obtienen de las siguientes expresiones (Glories, 1978):

**Proporción del color amarillo (%):**  $\% \text{ Am} = 100 \cdot (A_{420} / \text{IC})$

**Proporción del color rojo (%):**  $\% \text{ R} = 100 \cdot (A_{520} / \text{IC})$

**Proporción del color azul (%):**  $\% \text{ Az} = 100 \cdot (A_{620} / \text{IC})$

#### *4.2.1.2. Color del vino, color de los pigmentos resistentes a la decoloración por SO<sub>2</sub>, color de los antocianos libres, edad química del vino.*

Para la obtención de estos parámetros se ha seguido el método desarrollado por Somers y Evans (1974, 1977). El método se basa en la decoloración instantánea de los antocianos libres por la acción de SO<sub>2</sub> en exceso, al pH del vino, dejando como responsables del color residual a los pigmentos “poliméricos”.

**Reactivos:** Disolución de metabisulfito sódico (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) al 20 % (peso:volumen) preparada cada día.

Se mide la absorbancia de las muestras al pH del vino a 520 nm en la cubeta de 2 mm. La lectura corregida para 1cm de paso óptico es el parámetro **WC (Wine Color, Color del Vino)**.

$$\text{WC} = A_{520}$$

A continuación, a 2 ml de vino se le añade 0,003 ml de metabisulfito sódico al 20%, consiguiendo de esta manera una decoloración parcial del vino.

La lectura de la absorbancia residual a 520 nm es el parámetro denominado **PPC** (**Pigment Polymeric Color**, color de los pigmentos poliméricos o, más rigurosamente, **color de los pigmentos resistentes a la decoloración mediante SO<sub>2</sub>**).

$$CD_{SO_2} = A_{520}^{SO_2}$$

A partir de las medidas anteriores se obtiene **AC**, (**anthocyanin color**, **color de los antocianos libres**, o más rigurosamente, color de los compuestos antociánicos sensibles a la decoloración mediante SO<sub>2</sub>).

$$AC = WC - CD_{SO_2}$$

Y también la denominada **edad química del vino**, CAW (Wine Chemical Age), es decir, la proporción del color del vino asignable a los pigmentos resistentes a la decoloración por SO<sub>2</sub>.

$$CAW (\%) = 100 \times (CD_{SO_2}/WC)$$

Con este método podemos diferenciar entre dos grandes tipos de pigmentos, los antocianos libres o monoméricos sensibles al SO<sub>2</sub> y los compuestos resistentes al SO<sub>2</sub>. La contribución de unos y otros varía a lo largo de la vida del vino. Conforme envejece la contribución de los primeros disminuye a favor de la de pigmentos más estables y complejos.

El blanco a cada longitud de onda se realiza con agua destilada.

#### *4.2.1.3. Contenido total en antocianos monoméricos (o libres).*

El método (Giusti y Wrolstad, 2005) se basa en la modificación del color de los antocianos en función del pH. A pH 1 los antocianos libres se encuentran en sus formas coloreadas mientras que a pH 4.5 pasan a sus formas no coloreadas.

**Reactivos:****S1.** Solución tampón de cloruro de potasio 0.025 M, a pH 1.0

Para su preparación se mezcló 1.86 gramos de ClK con 980 ml de agua destilada. Se mide el pH añadiendo HCL concentrado hasta ajustarlo a 1.0. Se transfirió el líquido a un matraz aforado de 1 litro ajustando el volumen con agua destilada.

**S2.** Solución de acetato de sodio 0.4 M, a pH 4.5

Para su preparación se mezcló 32,82 gramos de acetato de sodio anhidro con 960 ml de agua destilada. Se midió su pH y se ajustó a 4.5 con HCl concentrado. Se transfirió el líquido a un matraz aforado de 1 litro hasta ajustar el volumen con agua destilada.

**Procedimiento:**

Se determinó el factor de dilución (con la solución S1) apropiado para la muestra de forma que la absorbancia (en cubeta de 1 cm) a la longitud de onda de máxima absorbancia (en nuestro 520 nm) esté dentro del rango lineal del espectrofotómetro. El factor de dilución utilizado fue de 8.

Se prepararon dos diluciones de la muestra: una con la solución S1 (pH 1) y otra con la solución S2 (pH 4.5), empleando en ambos casos el factor de dilución anteriormente determinado. A continuación se midieron las absorbancias de cada dilución a dos longitudes de onda; 520 nm (longitud de máxima absorbancia) y 700 nm. Se realizaron las medidas entre 15 minutos y 1 hora tras la preparación de las diluciones. Tiempos superiores tienden a incrementar las lecturas. El blanco a cada longitud de onda se realiza con agua destilada.

Con las medidas obtenidas se calcula A como la diferencia de las absorbancias de la muestra diluida de la siguiente manera:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH1}} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH4.5}}$$

Después se calculó la concentración en antocianos monoméricos totales de la muestra con la siguiente fórmula:

$$\text{Antocianos monoméricos totales (mg/l)} = (A \times \text{FD} \times \text{PM} \times 1000) / (\epsilon \times 1)$$

**Siendo:**

- FD es el factor de dilución (8)
- PM y  $\epsilon$  son respectivamente el peso molecular y el coeficiente de absorción molar del antociano de referencia utilizado para expresar los resultados. En este caso se trata del 3-monoglucósido de cianidina (PM = 449,2 y  $\epsilon$  = 26,900).

*4.2.1.4. Polifenoles totales – Indice de Folin-Ciocalteu*

Este método desarrollado por Singleton y Rossi (1965), se fundamenta en el empleo del reactivo de Folin-Ciocalteu, que mezcla ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, que se reduce para oxidar a los fenoles, en una mezcla de óxido de tungsteno y molibdeno, que transforma la solución a color azul. Esta coloración presenta su absorción máxima alrededor de los 750nm y es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos en la muestra de vino.

Es un método universal y muy habitual que permite obtener una buena estimación de la riqueza global en compuestos fenólicos en vinos, bebidas y extractos vegetales.

**Reactivos:**

- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Disolución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% (peso:volumen): se disolvió 200 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en alrededor de 1 L de agua en ebullición. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, ajustar el volumen a 1 L.

**Procedimiento:**

En un matraz aforado de 100 ml se introdujo 1 ml de muestra diluida al 50% y se añadieron 50 ml de agua destilada. A continuación se añadió 5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó y se dejó reposar 2-3 minutos. Después se añadió 20 ml de la solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , preparada anteriormente, y se enrasó hasta 100 ml con agua destilada, agitando una vez enrasado para homogeneizar la mezcla.

Transcurridos 30 minutos en los que la reacción concluye y se estabiliza, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en cubeta de 1 cm de paso, empleando agua destilada como referencia.

Para determinar el contenido en polifenoles totales se realizó una recta patrón, teniendo en cuenta la dilución realizada de la muestra ( $FD = 2$ ). La recta patrón ( $R = 0,9966$ ) se realizó aplicando el mismo método a soluciones patrón sin diluir de ácido gálico (entre 0 y 1000 mg/l) los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por litro.



**Figura 9. Proceso elaboración de la recta patrón ácido gálico. Inicio.**



**Figura 10. Proceso de elaboración de la recta patrón ácido gálico. Transcurridos 30 minutos.**

#### *4.2.1.5. Índice de polifenoles totales – IPT*

Todos los compuestos fenólicos presentan un máximo de absorción en el espectro ultravioleta, hacia los 280 nm. La absorbancia a 280 nm o IPT aporta una idea estimativa de la riqueza en polifenoles totales del vino, mosto o extracto que se esté analizando.



**Procedimiento:**

Para su medición se diluyó la muestra para obtener un valor de absorbancia medible. En los vinos tintos de uva se suelen diluir de 1:50 a 1:100. En el caso de la mora y de la mezcla se tomó 0,1 ml de muestra diluido en 5 ml de agua destilada mientras que en el caso de la manzana se utilizó 0,2 ml de vino diluido en 4 ml de agua destilada.

Las lecturas se realizaron en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Para obtener el IPT se multiplicaron las lecturas espectrofotométrica por el factor de dilución (FD= 51).

$$IPT=A_{280}^{1/51} * FD$$

#### 4.2.2. Determinación de la actividad antioxidante en vinos (método DPPH)

Este método está basado en la técnica de Rivero-Pérez y González- Sanjosé (2007), con algunas modificaciones. Todas las medidas fueron realizadas en un espectrofotómetro Cintra 20 (GMBH, Alemania) de doble haz utilizando metanol como blanco de comparación.

**Reactivos:** metanol y 2,2-difenil-1-picril-hidracil (DPPH).

**Procedimiento:**

Se mezclaron 0,060 ml de una dilución 1/20 con 2,940 ml de solución metanólica de 2,2-difenil-1-picril-hidracil (DPPH) con una concentración de 60  $\mu$ M (0,0023 g/ 100 ml de CH<sub>3</sub>OH) en una cubeta desechable de poliestireno de 1 cm de paso. A continuación se midió la absorbancia a 515 nm (esta medida fue definida como tiempo cero, es decir, sin haber sufrido la muestra actividad antioxidante). Transcurrida una hora se volvió a tomar la medida de la misma manera de la muestra que ha sufrido la oxidación por parte del DPPH. La diferencia de absorbancia es proporcional a la actividad antioxidante de la muestra.

La actividad antioxidante se obtuvo como milimoles de trolox por litro de vino mediante la interpolación de los valores de absorbancia en una curva patrón. La recta patrón ( $R^2= 0,9997$ ) se realizó mediante la representación de la diferencia de las absorbancias obtenidas siguiendo el mismo método antes explicado en diluciones seriadas de 0,25 a 1 milimoles de Trolox por litro.

#### 4.2.3. Determinación de antocianos mediante HPLC

Para la determinación de los compuestos antociánicos de los vinos mediante HPLC se siguió la metodología usada por Vasco et al. (2009) y con las modificaciones aportadas por Urretavizcaya (2010).

Se analizaron las muestras mediante inyección directa con un cromatógrafo Waters 2695 (Waters, USA) equipado con un detector variable UV/VIS Waters 996 (Waters, USA) configurados para medir la absorbancia entre 250 y 600 nm.

La separación fue realizada usando una columna LiChroCart 250 mm x 2 mm, con relleno START RP-18 de 5 µm (Merck, Alemania), protegida con una precolumna de 4 x 4 mm rellena del mismo material, mantenida a 40 °C. Cada muestra fue previamente filtrada con filtros hidrolíticos desechables de jeringa PVDF 0,45 µm (Teknokroma, España). Las fases móviles utilizadas fueron ácido fórmico al 5% (A) y acetonitrilo (B), el volumen de inyección fue 20 µl y el gradiente se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5: Gradiente utilizado para la de terminación de antocianos mediante HPLC**

<b>Tiempo</b>	<b>Fase A (%)</b>	<b>Fase B (%)</b>
<b>0</b>	95	5
<b>5</b>	90	10
<b>10</b>	90	10
<b>30</b>	58	42
<b>35</b>	95	5
<b>45</b>	95	5

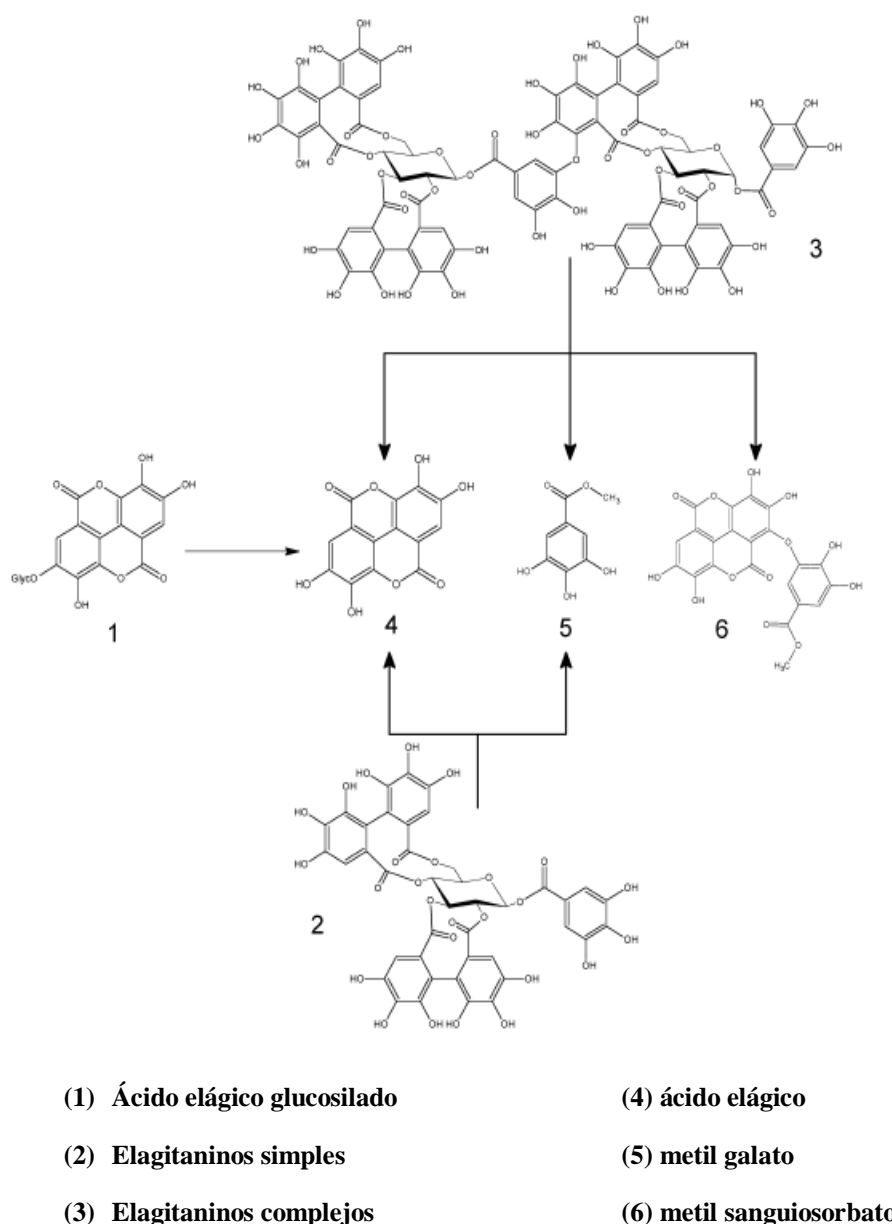
La identificación de los antocianos presentes se basó en la comparación de los tiempos de retención y de los espectros de absorción de los diferentes picos cromatográficos con los observados por Urretavizcaya (2010), la bibliografía consultada y con dos patrones utilizados (cianidina-3-glucósido y cianidina-3-rutinósido) correspondientes a los dos picos principales observados.

La cuantificación se realizó a partir de las áreas obtenidas a 520 nm de los diferentes picos en base a dos rectas de calibrado. Para la cianidina-3-glucósido, así como para los antocianos minoritarios se utilizó la recta patrón de dicho compuesto ( $R^2 = 0,999$ ) realizada con concentraciones entre 0 y 110 mg/l. Para el pico principal, identificado como cianidina-3-rutinósido, se elaboró una segunda recta de calibrado ( $R^2 = 0,999$ ) con concentraciones entre 0 y 200 mg/l.

#### 4.2.4. Determinación de elagitaninos mediante HPLC

Para la determinación y cuantificación de elagitaninos mediante HPLC se ha seguido la técnica descrita por Vrhovsek et al. (2006), con las modificaciones aportadas por Urretavizcaya (2010).

Para la cuantificación de elagitaninos es necesaria una hidrólisis ácida previa, y así cuantificar entre otros subproductos de la reacción el ácido elágico como se puede observar en la figura 11.



**Figura 11. Representación esquemática de la hidrólisis ácida de los elagitaninos de *Rubus spp.***  
Fuente: Vrhovsek et al (2006)

#### 4.2.4.1. Método de hidrólisis

**Reactivos:** metanol, ácido clorhídrico concentrado (37%), hidróxido de sodio 4 N.

**Procedimiento:**

Se diluyeron 20 ml de muestra de vino con 13,4 ml de metanol y 16,6 ml de HCL al 37%. La mezcla se introdujo en matraces redondos de 250 ml en un baño a 85°C con refrigerantes para la condensación y reflujo del metanol (figura 12) durante 4 horas, ya que este fue el tiempo determinado como óptimo en el estudio anterior. Tras la hidrólisis el volumen de líquido resultante se ajustó a 50 ml con metanol. Antes de realizar en análisis cromatográfico se mezclaron 5 ml de la mezcla anterior con 3 ml de NaOH 4 N y 2 ml de metanol para llevar su pH a un valor cercano a 2.5. Se realizaron dos repeticiones de la hidrólisis por cada muestra.



**Figura 12: Dispositivo para la hidrólisis de los elagitaninos**

#### 4.2.4.2. Método HPLC

**Reactivos:** ácido fórmico, acetonitrilo, ácido gálico

**Método cromatográfico:**

Se analizaron las muestras antes y después de la hidrólisis por inyección directa con un cromatógrafo Waters 2695 (Waters, USA) equipado con un detector variable UV/VIS Waters 996 (Waters, USA) y configurado para medir la absorbancia entre 240 y 450 nm.

La separación fue realizada usando una columna LiChroCART 250 mm x 2 mm, con relleno START RP- 18 de 5  $\mu\text{m}$  (Merk, Alemania), protegida con una precolumna de 4 x 4 mm rellena del mismo material. Cada muestra fue filtrada previamente a la inyección con filtros hidrofílicos desechables de jeringa PVDF 0,45  $\mu\text{M}$  (Teknokroma, España). El volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{l}$ . Las fases móviles utilizadas fueron ácido fórmico al 1% (A) y acetonitrilo (B). El flujo en columna fue de 0,3 ml/ min, siendo el gradiente utilizado el que se muestra en la tabla 6.

**Tabla 6: Gradiente utilizado para la de terminación de antocianos mediante HPLC**

<b>Tiempo</b>	<b>Fase A (%)</b>	<b>Fase B (%)</b>
<b>0</b>	95	5
<b>5</b>	90	10
<b>10</b>	90	10
<b>25</b>	50	50
<b>40</b>	95	5
<b>50</b>	95	5

La cuantificación de las áreas obtenidas a 254 nm se llevó a cabo usando como referencia una recta de calibrado ( $R^2 = 0,998$ ) para el ácido elágico con concentraciones de 0 a 200 mg/l.

#### **4.3.Tratamientos estadísticos**

El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa SPSS Statistics 17.0. En un primer paso se realizó un ANOVA de un factor para cada uno de los parámetros estudiados en los diferentes vinos, a partir de los valores medios obtenidos, y conocer así si existen o no diferencias significativas entre ellos debido a las diferentes proporciones de frutas, con un nivel de confianza del 95%.

Para cada caso se aplicó un contraste de rango múltiple al 95% de confianza con el método Duncan, para determinar entre qué niveles se producían las diferencias significativas.

Por otro lado, para evaluar las posibles relaciones entre las variables a estudio, en particular entre la actividad antioxidante y la composición fenólica de los vinos, se realizaron análisis de correlaciones simples de Pearson.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Para la realización del análisis de los resultados y la discusión de los mismos el siguiente apartado se estructura en tres partes, las correspondientes a cada uno de los bloques de análisis: color y composición global, antocianos y finalmente elagitaninos. En cada una de las partes se estudia primero los vinos de mora y a continuación los vinos de mezcla. Finalmente se analizan las correlaciones entre todas las variables descritas, tanto para los vinos de mora como los de mezcla.

## **5.1. Color y composición fenólica global**

### **5.1.1. Vinos de mora**

En primer lugar se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) a cada uno de los parámetros analizados relacionados con el color para conocer si existían diferencias o no entre los vinos, en relación a la proporción de mora utilizada.

En la tabla 7 se muestran las medidas de absorbancia  $A_{420}$ , que explica la intensidad de color amarillo, la  $A_{520}$  relativa al color rojo y la  $A_{620}$  del color azul, expresadas como % con respecto al total, así como dos parámetros relacionados con las mismas, la intensidad colorante (IC) y la tonalidad (T). Para todos ellos se encontraron diferencias significativas con respecto a la concentración de mora.

Al igual que lo observado por Urretavizcaya (2010), el rojo fue el componente más importante de los tres, seguido del amarillo, siendo el azul el componente minoritario del color de los vinos, lo cual tiene relación con el hecho de que estos vinos son considerados vinos jóvenes.

Se observa como los componentes amarillo y azul aumentan con la concentración de fruta mientras que el color rojo disminuye, esto indicaría que el aumento de la concentración de mora propicia vinos con una mayor evolución en su color.

Tanto la intensidad colorante como la tonalidad tienen una tendencia creciente con el aumento de concentración de mora en los vinos. El aumento de la intensidad colorante (IC) parece evidente ya que también aumentamos la cantidad de antocianos responsables del color en los vinos de mora.

Del mismo modo, es coherente la diferencia significativa encontrada entre la tonalidad (T) y los distintos vinos analizados puesto que como se ha indicado conforme aumenta la proporción de fruta aumenta la proporción de color amarillo sobre el de rojo.

**Tabla 7: parámetros de color (A420, A520, A620, IC y T) de los vinos de mora según la concentración de fruta empleada en la elaboración (a1, a2 , a3).**

	a1		a2		a3		p-valor
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
%Am	33,36 <sup>a</sup>	0,32	34,85 <sup>b</sup>	0,54	35,34 <sup>b</sup>	0,66	0,001
%R	63,55 <sup>b</sup>	0,56	59,77 <sup>a</sup>	1,18	58,95 <sup>a</sup>	1,04	0,000
%Az	3,09 <sup>a</sup>	0,30	5,38 <sup>b</sup>	0,67	5,70 <sup>b</sup>	0,47	0,000
IC	2,83 <sup>a</sup>	0,16	4,68 <sup>b</sup>	0,55	6,23 <sup>c</sup>	0,65	0,000
T	0,52 <sup>a</sup>	0,01	0,58 <sup>b</sup>	0,02	0,60 <sup>b</sup>	0,02	0,001

En cuanto a las medidas de color más ligadas a la presencia de antocianos, en la Tabla 8 se muestran los parámetros WC, PPC, AC y CAW. El parámetro WC (color del vino) cuantifica el color rojo, AC informa del color de los antocianos libres que se decoloran instantáneamente por la acción del SO<sub>2</sub>, CD<sub>SO2</sub> cuantifica el color relacionado con los derivados antociánicos resistentes a dicha acción, mientras que CAW (edad química del vino) habla de la proporción de rojo del vino debido a estos pigmentos poliméricos.

En los cuatro parámetros mencionados se observan diferencias significativas entre los distintos vinos, de hecho, todos ellos se ven en incremento con el aumento en la proporción de mora.

Este resultado está de acuerdo con lo comentado anteriormente, ya que, al aumentar la proporción de fruta en la elaboración de los vinos también aumentamos la concentración pigmentos. El incremento del parámetro CAW también corrobora la hipótesis de que los vinos con mayor cantidad de fruta tienen una mayor evolución en su color.

**Tabla 8: Parámetros de color (WC, PPC, AC, CAW) de los vinos de mora según la concentración de fruta empleada en la elaboración (a1, a2, a3).**

	a1		a2		a3		p-valor
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
WC	1,80 <sup>a</sup>	0,09	2,80 <sup>b</sup>	0,34	3,67 <sup>c</sup>	0,36	0,000
CD <sub>SO2</sub>	0,31 <sup>a</sup>	0,02	0,80 <sup>b</sup>	0,15	1,27 <sup>c</sup>	0,24	0,000
AC	1,49 <sup>a</sup>	0,09	1,99 <sup>b</sup>	0,30	2,40 <sup>c</sup>	0,13	0,000
CAW	17,2 <sup>a</sup>	1,4	28,8 <sup>b</sup>	4,9	34,3 <sup>b</sup>	3,3	0,000



En la siguiente tabla (tabla 9) se muestran los resultados relativos a la composición polifenólica global y la actividad antioxidante de los distintos vinos de mora. En concreto, los parámetros estudiados fueron los antocianos monoméricos totales o libres (AT), el índice de polifenoles totales (IPT), los polifenoles totales (PT) y la actividad antioxidante (AA).

Los valores obtenidos oscilaron entre 35,7 y 71,0 mg/ l (antocianos libres), 602 y 1217 mg/l (polifenoles totales), 18,3 y 44,5 (índice de polifenoles totales), y 3,82 y 9,21 milimoles trolox/ l (actividad antioxidante). En principio, estos resultados obtenidos son inferiores a los del estudio anterior, sin embargo, hay que tener en cuenta que las condiciones de elaboración no son las mismas.

Si comparamos los datos con los de similares condiciones de elaboración del estudio anterior, el contenido de polifenoles totales así como el IPT de los vinos fue equivalente, mientras que los antocianos totales y la capacidad antioxidante son inferiores.

Se encontraron diferencias significativas en todos los parámetros excepto en los antocianos libres totales, aunque se observa de igual modo un aumento con el contenido de fruta, este no es estadísticamente significativo.

**Tabla 9: Composición fenólica global (AT, IPT, PT) y actividad antioxidante (AA) de los vinos de mora según la concentración de fruta empleada en la elaboración (a1, a2, a3).**

	a1		a2		a3		p-valor
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
AT	52,2	4,5	51,5	15,3	56,6	3,5	0,717*
IPT	19,6 <sup>a</sup>	1,5	36,1 <sup>b</sup>	1,7	41,6 <sup>c</sup>	2,9	0,000
PT	635 <sup>a</sup>	41	972 <sup>b</sup>	61	1173 <sup>c</sup>	51	0,000
AA	4,07 <sup>a</sup>	0,20	7,32 <sup>b</sup>	0,48	8,84 <sup>c</sup>	0,35	0,000

#### 5.1.2. Vinos de mezcla

En los vinos de mezcla, elaborados con distintas proporciones de mora, manzana y agua, se han medido los mismos parámetros y seguido el mismo procedimiento que en el caso anterior de los vinos de mora.

Inicialmente la composición de los vinos estaba propuesta con la composición descrita en el apartado de material y métodos, de modo que el vino a1 debía tener mayor proporción de manzana (1:2), el a3 mayor proporción de mora (2:1), mientras que el vino intermedio a2 tiene la misma proporción de cada fruta (1:1), teniendo los tres la misma proporción a agua (2/3).

Sin embargo, debido a un error en la elaboración, la composición real es la siguiente:

**Tabla 10: Proporción final mora: manzana: agua de los vinos de mezcla**

	Mora	Manzana	Agua
a1	11%	22%	67%
a2	25%	25%	50%
a3	22%	11%	67%

De modo que existe una variación con respecto a lo planificado en los vinos a2, que, aunque si tienen la misma proporción de ambas frutas, son los que tiene mayor cantidad de fruta total.

En cuanto a las medidas directas de color, todas ellas muestran diferencias significativas en relación a la proporción mora-manzana. Como se puede observar en la tabla 11, el color rojo es dominante en los tres vinos, al igual que ocurría en los vinos de sólo mora, lo cual nos indica que los pigmentos aportados por la mora ejercen una mayor influencia incluso cuando la manzana se encuentra en doble proporción que la mora. Se observa como el % de rojo se va incrementando, de manera más notable en el tercer vino, ya que aunque no es el que más mora total presenta, si es el de mayor mora con respecto a la manzana, por lo que se prevé una posible influencia de la manzana sobre el color de los vinos. En cuanto al % amarillo y al azul se observa la misma tendencia pero de sentido contrario, ya que disminuyen conforme es mayor la proporción de mora con respecto a la de manzana.

La mayor intensidad colorante en esta ocasión se presenta en el vino a2, ya que es el que tiene la mayor proporción de ambas frutas, además de ser el que mayor cantidad de mora, mientras que la tonalidad disminuye conforme aumenta la proporción de mora con respecto a la manzana, observándose diferencias significativas realmente en el vino a3 con respecto a los otros dos, puesto que es realmente en este vino donde la proporción de manzana es menor.

**Tabla 11: parámetros de color (A420, A520, A620, IC y T) de los vinos de mezcla según la concentración de fruta empleada en la elaboración (A1, A2, A3).**

	a1		a2		a3		p-valor
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
%Am	35,91 <sup>b</sup>	0,07	35,56 <sup>a</sup>	0,42	34,20 <sup>a</sup>	0,75	0,002
%R	55,07 <sup>a</sup>	1,31	55,90 <sup>a</sup>	1,35	61,50 <sup>b</sup>	1,61	0,000
%Az	9,02 <sup>b</sup>	1,32	8,53 <sup>b</sup>	1,64	4,30 <sup>a</sup>	0,89	0,001
IC	2,36 <sup>a</sup>	0,16	4,72 <sup>c</sup>	0,52	3,45 <sup>b</sup>	0,32	0,000
T	0,65 <sup>b</sup>	0,01	0,64 <sup>b</sup>	0,01	0,56 <sup>a</sup>	0,03	0,000

De forma similar ocurre con el resto de parámetros relacionados con el color rojo del vino debido a la presencia de antocianos (tabla 12). El color del vino (WC) es estadísticamente distinto en los tres vinos analizados y superior en el caso a2, puesto que es el vino con mayor proporción de mora de los tres, y es esta fruta la que aporta la pigmentación roja (antocianos). En cuanto a la procedencia de estos antocianos (poliméricos o libres) el vino a2 muestra una mayor presencia de pigmentos derivados, y es el vino a3 el que más antocianos libres tiene, lo cual parece indicar que, cuando hay mayor presencia de manzana son mayores las reacciones de polimerización de antocianos, consiguiendo pigmentos más estables. Relacionado con este hecho se encuentra el parámetro CAW que expresa la evolución de un vino, ya que, es el vino a3 el vino que menor evolución presenta, y el que realmente es estadísticamente diferente en cuanto a este parámetro. De nuevo es la presencia de mayor cantidad de mora (que implica mayor cantidad de pigmentos) pero también de mayor cantidad de manzana (favoreciendo la formación de nuevos pigmentos poliméricos) la que propicia vinos con una mayor estabilidad en su color y por tanto una mayor evolución.

**Tabla 12: parámetros de color (WC, PPC, AC, CAW) de los vinos de mezcla según la concentración de fruta empleada en la elaboración (a1, a2, a3).**

	a1		a2		a3		p-valor
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
WC	1,30 <sup>a</sup>	0,08	2,63 <sup>c</sup>	0,24	2,12 <sup>b</sup>	0,17	0,000
CD <sub>SO2</sub>	0,58 <sup>a</sup>	0,10	1,22 <sup>b</sup>	0,29	0,47 <sup>a</sup>	0,09	0,001
AC	0,72 <sup>a</sup>	0,11	1,41 <sup>b</sup>	0,09	1,65 <sup>c</sup>	0,12	0,000
CAW	44,3 <sup>b</sup>	7,5	45,8 <sup>b</sup>	7,8	22,1 <sup>a</sup>	3,6	0,001

En lo referido a la composición fenólica y la capacidad antioxidante de los vinos, los resultados oscilan entre 10,8 y 63,4 mg/l (antocianos libres), 861 y 1506 mg/l (polifenoles totales), 23,5 y 48,4 (índice de polifenoles totales) y 5,17 y 9,81 milimoles trolox/ l (actividad antioxidante). Se trata en general de valores superiores que los obtenidos en los vinos de mora debido a la aportación de compuestos polifenólicos de la manzana. Sin embargo, el contenido de antocianos libres es inferior ya que es la mora la única responsable de la presencia de esta sustancia.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todos estos parámetros (tabla 13). Los antocianos totales, al igual que ocurría en los vinos de mora, se van incrementando con forme aumenta la proporción de mora con respecto a la manzana. Sin embargo en el resto de parámetros, relacionados con los polifenoles totales y su capacidad antioxidante, es el vino a2 el que cuenta con mayores valores puesto que es el vino que tiene mayor cantidad de fruta total, y mayor cantidad de mora y de manzana individualmente si lo comparamos con los otros dos.

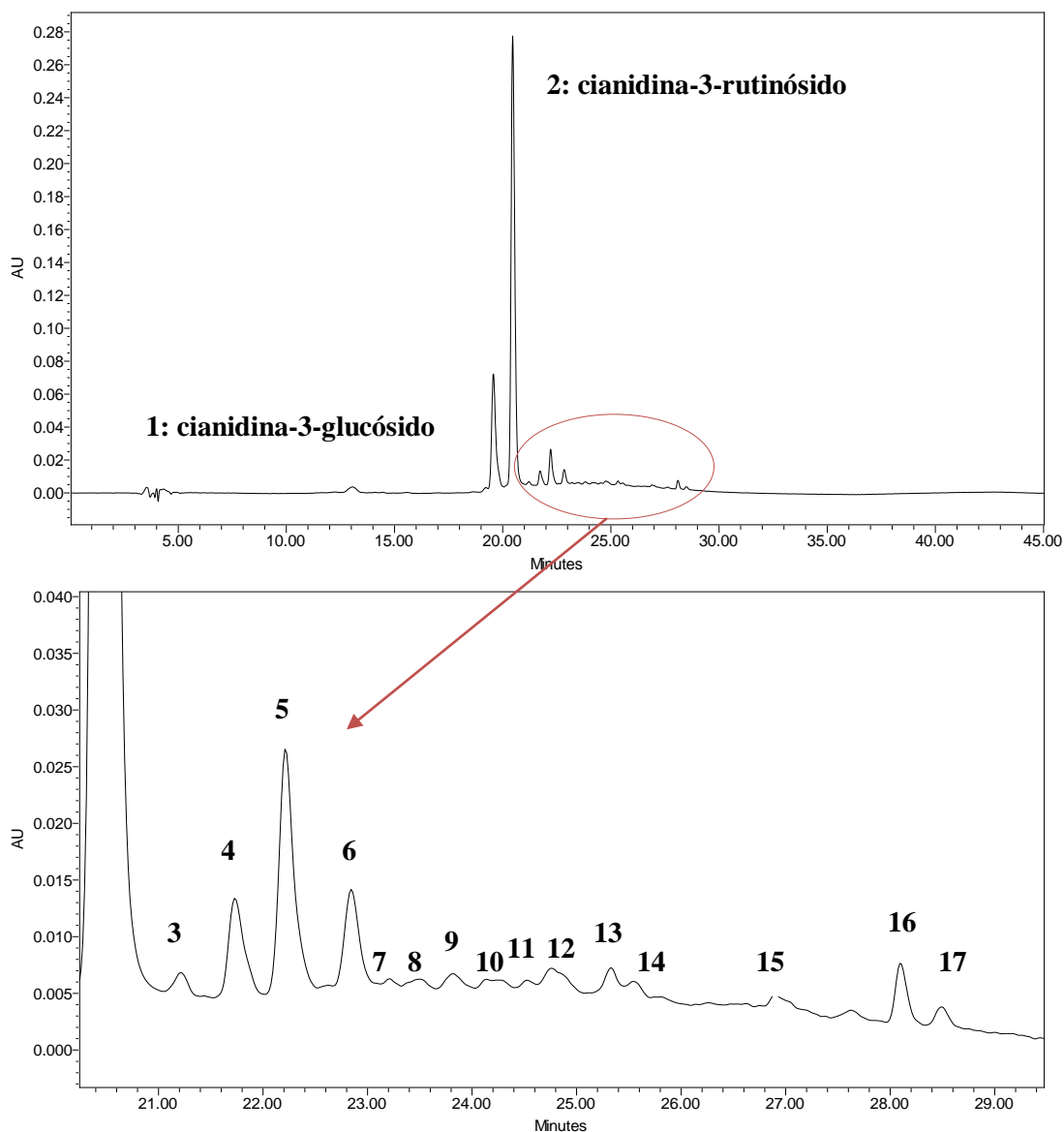
**Tabla 13: composición fenólica global (AT, IPT, PT) y actividad antioxidante (AA) de los vinos de mezcla según la concentración de fruta empleada en la elaboración (a1, a2, a3).**

	a1		a2		a3		p-valor
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
AT	15,1 <sup>a</sup>	3,0	25,7 <sup>a</sup>	7,4	55,2 <sup>b</sup>	8,9	0,000
IPT	26,8 <sup>a</sup>	3,6	45,7 <sup>c</sup>	2,4	31,5 <sup>b</sup>	2,4	0,000
PT	936 <sup>a</sup>	72	1426 <sup>c</sup>	70	1061 <sup>b</sup>	18	0,000
AA	5,56 <sup>a</sup>	0,38	9,21 <sup>c</sup>	0,56	6,79 <sup>b</sup>	0,31	0,000

## 5.2. Antocianos

### 5.2.1. Vinos de mora

En la figura 13, se muestra uno de los cromatogramas obtenidos en el análisis de antocianos de los vinos de mora mediante HPLC. Se obtuvieron 17 picos con espectros de absorción relacionados con compuestos antociánicos y similares a los encontrados por Urretavizcaya (2010).



**Figura 13: Cromatograma a 520 nm de un vino de mora.**

Los dos picos principales son el glucósido de cianidina y el rutinósido de cianidina, ambos identificados con los correspondientes patrones.

El glucósido de cianidina varía del 15,2% en los vinos con menos proporción de mora a 19,5% los de mayor, siendo el rutinósido de cianidina el antociano mayoritario con casi un 65% de la suma de las áreas de todos los picos integrados a 520 nm en los vinos con mayor proporción de fruta. Estas proporciones se encuentran en sintonía con lo encontrado en 2010 por Urretavizcaya cuyos resultados fueron de un 18% para el glucósido de cianidina y un 68% para el rutinósido de cianidina. Del mismo modo concuerda con los resultados obtenidos por Garzon *et al.* (2009) y Mertz *et al.* (2007) quienes obtuvieron valores del 35% de glucósido de cianidina y un 62% de rutinósido de cianidina aproximadamente. Mientras que se contradice con lo publicado por Vasco *et al.* (2009) quien obtuvo como antociano mayoritario en glucósido de cianidina con un 67% y el rutinósido de cianidina con un 31% en sus muestras de *Rubus glaucus*.

Junto a los dos antocianos principales se han detectado 15 picos más que no han podido ser claramente identificados. Sin embargo, por sus similares características espectrales (figura 14) y tras aplicar un análisis de correlaciones (anexo 3) se han agrupado de la siguiente manera:

**Tabla 14: Grupos de antocianos generados por su elevada correlación**

Pico	Grupo
Cianidina-3-glucósido	Ci-Glu
Cianidina-3-rutinósido	Ci-Ru
Picos 3 y 4	A_Min1
Picos 5, 16 y 17	A_Min2
Picos 6, 7, 8, 9-10, 11-12, 13 y 14	A_Min3

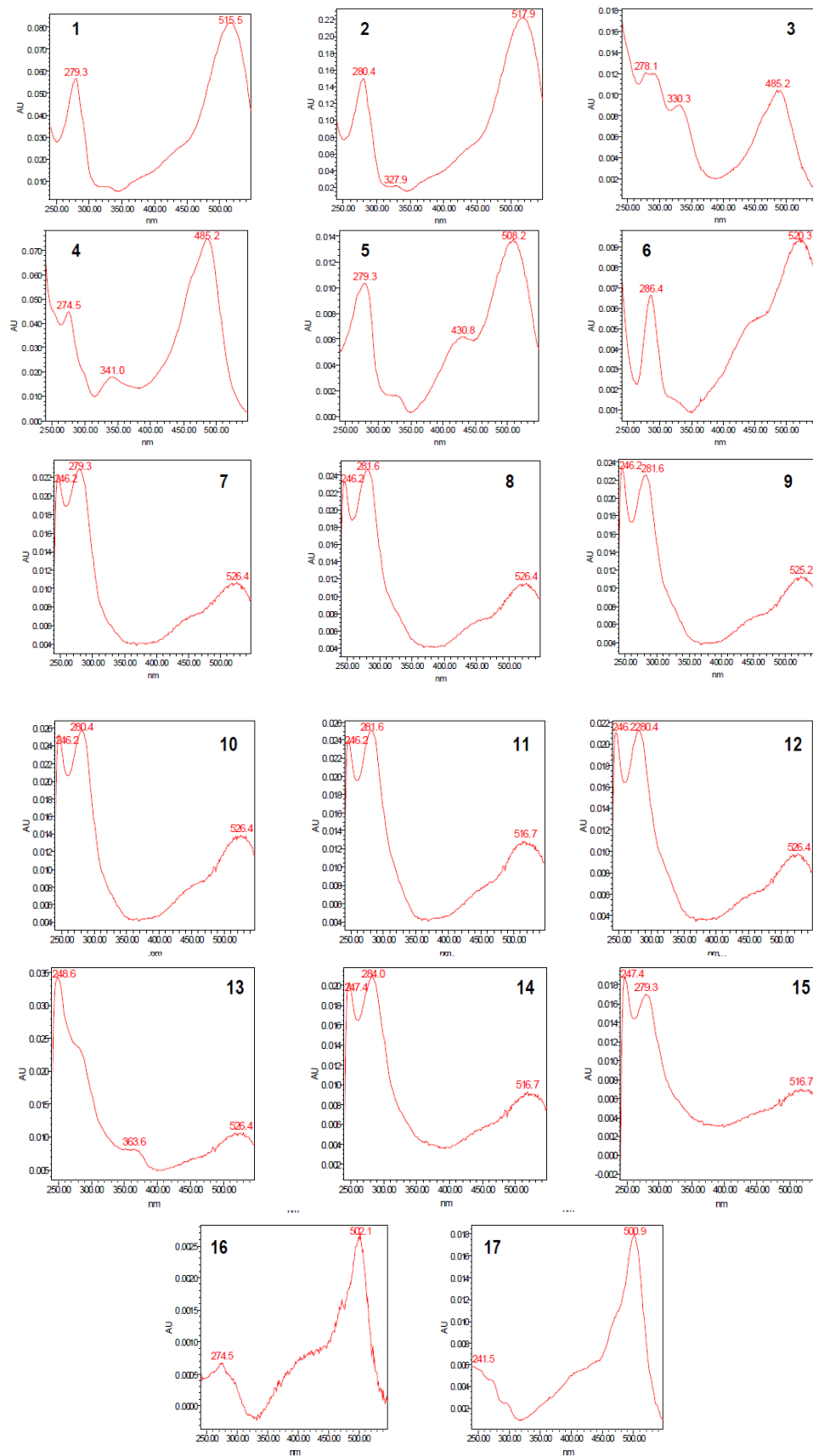


Figura 14: espectros de absorción de los picos encontrados y correspondientes a la fig 13.

Por sus espectros de absorción se pueden hacer algunas suposiciones; los picos agrupados como A\_min2 (7,62-8,6% del total) tienen máximos de absorción entre 501 y 509 nm, con un hombro pronunciado hacia los 430-440 nm, característico de los compuestos relacionados con la pelargonidina (Castillo, 2009) compuestos procedentes de la biosíntesis de antocianos en la fruta. El grupo A\_Min1 (2,8-4,76 % del total) formado por los dos picos siguientes al rutinósido de cianidina, presentan un máximo de absorción desplazado hacia longitudes más bajas (485-488 nm) relacionado con tonalidades anaranjadas. Finalmente, hay un elevado número de picos con un máximo de absorción entre 516-520, agrupados como A\_Min3 (8,53-14,1 % del total) que debido a la elevada correlación obtenida con los picos que conforman A\_min1 podrían también corresponder a antocianos derivados del proceso de elaboración y conservación de los vinos, y como resultados de reacciones entre los antocianos libres y otros constituyentes del vino, fenólicos (flavanoles, principalmente) o no (acetaldehído, ácido purúvico, etc). Estos compuestos son los responsables de la evolución hacia tonalidades amarillas que sufre el color en los vinos de uva y cabe suponer, también en todos aquellos vinos no tradicionales elaborados con frutas ricas en antocianos.

Los valores de antocianos totales obtenidos en los vinos de mora oscilaron entre 39,1 y 84,8 mg/l, similares a los del apartado anterior y del mismo modo relacionado con lo ya comentado sobre los antocianos obtenidos en el estudio anterior.

En cuanto a las diferencias existentes entre los vinos de mora según su composición antociánicos sólo se encuentran de manera estadísticamente significativa en el grupo de antocianos denominado como A\_min1 y A\_min3, aquellos que inicialmente se han relacionado con procesos de transformación de antocianos durante la elaboración y la conservación de los vinos. En ambos casos se observa un incremento con el aumento de la proporción de mora en los vinos, siendo sólo realmente significativa entre el primero y los dos restantes. Esto se encuentra en consonancia con lo comentado anteriormente de que la presencia de más cantidad de mora favorece la evolución del color de los vinos.



**Tabla 15: Antocianos obtenidos mediante HPLC de los vinos de mora con las distintas proporciones (a1, a2, a3).**

	a1		a2		a3		p-valor
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
Cyglu	10,3	3,5	10,7	4,1	11,7	1,4	0,807*
Cyrut	43,8	10,5	31,4	13,6	30,8	3,4	0,176*
A_min1	1,9 <sup>a</sup>	0,7	2,8 <sup>b</sup>	0,5	2,7 <sup>b</sup>	0,8	0,004
A_min2	5,1	1,4	5,0	1,2	4,7	0,6	0,872*
A_min3	5,8 <sup>a</sup>	0,6	7,7 <sup>b</sup>	0,6	8,5 <sup>b</sup>	0,9	0,001
Anttot	67,60	16,382	58,36	20,043	60,28	4,2	0,673*

### 5.2.2. Vinos de mezcla

Los valores de antocianos totales obtenidos en los vinos de mora oscilaron entre 16,1 y 91,6 mg/l, siendo similares a los del vino de mora, aunque también la variabilidad es más amplia por las diferencias entre concentraciones de mora entre los dos tipos de vinos.

De forma singular, en el caso de los vinos de mezcla ocurre una situación especular con respecto a los vinos de mora (tabla 16), ya que se producen diferencias significativas entre todas las variables antociánicas estudiadas excepto en los grupos A\_min1 y A\_min3. En todos los casos las diferencias se observan entre los dos primeros vinos con el tercero, es decir el aumento de antocianos se observa realmente cuando la mora con respecto a la manzana es mayoritaria, ya que es esta fruta la que aporta este tipo de compuestos.

**Tabla 16: Antocianos obtenidos mediante HPLC de los vinos de mezcla con las distintas proporciones (a1, a2, a3).**

	A1		A2		A3		p-valor
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
Cyglu	1,8 <sup>a</sup>	0,6	2,7 <sup>a</sup>	1,6	12,4 <sup>b</sup>	2,9	0,000
Cyrut	4,6 <sup>a</sup>	1,9	10,4 <sup>a</sup>	8,9	54,6 <sup>b</sup>	10,2	0,000
A_min1	1,6	0,7	1,9	0,1	1,8	0,8	0,710*
A_min2	3,1 <sup>a</sup>	0,5	3,6 <sup>a</sup>	1,0	5,9 <sup>b</sup>	0,5	0,001
A_min3	7,4	0,6	7,8	0,9	7,2	0,8	0,495*
Anttot	19,4 <sup>a</sup>	3,6	27,3 <sup>a</sup>	12,2	82,3 <sup>b</sup>	11,8	0,000

### 5.3. Elagitaninos

#### 5.3.1. Vinos de mora

En la figura (15) se muestran los cromatogramas a 254 nm antes y después de la hidrólisis de elagitaninos.

Tras la hidrólisis se detectaron 6 picos. El tercero de ellos fue identificado como el ácido elágico en comparación con la sustancia patrón. Su espectro de absorción (figura 16) presenta dos longitudes de onda máxima; 254 y 364 nm. Se trata del componente mayoritario tras la hidrólisis (entre el 50 y el 65% del total), al igual que lo publicado por Vrhovsek *et al.*, (2006).

Los picos 4 y 5 no pudieron separarse con claridad en todos los vinos, por lo que finalmente se cuantificaron de manera conjunta. No supone demasiada variación puesto que en aquellos vinos en lo que se consiguió la separación, la cuantificación del pico 5 era mínima.

Los picos 2 y 4 son los siguientes en importancia. Ambos presentan un espectro de absorción semejante, con máximos a 371 nm. Según los tiempos de retención observados por Vrhovsek *et al.* (2006), el pico 4 parece corresponderse con el metil sangisorbato y el pico 2 con el que ellos denominan “derivado 1” al no haber sido identificado con ningún compuesto concreto. Por último el pico 1, minoritario, tenía un espectro de absorción y tiempo de retención similar al del metil galato (Vrhovsek *et al.*, 2006), muy distinto al del ácido elágico.

Para la cuantificación de ácido elágico libre se utilizó el obtenido de la inyección directa de las muestras previamente a su hidrólisis, mientras que los elagitaninos totales se han obtenido mediante la diferencia entre la suma de la concentración de los productos de la hidrólisis y el ácido elágico libre previo a la hidrólisis.

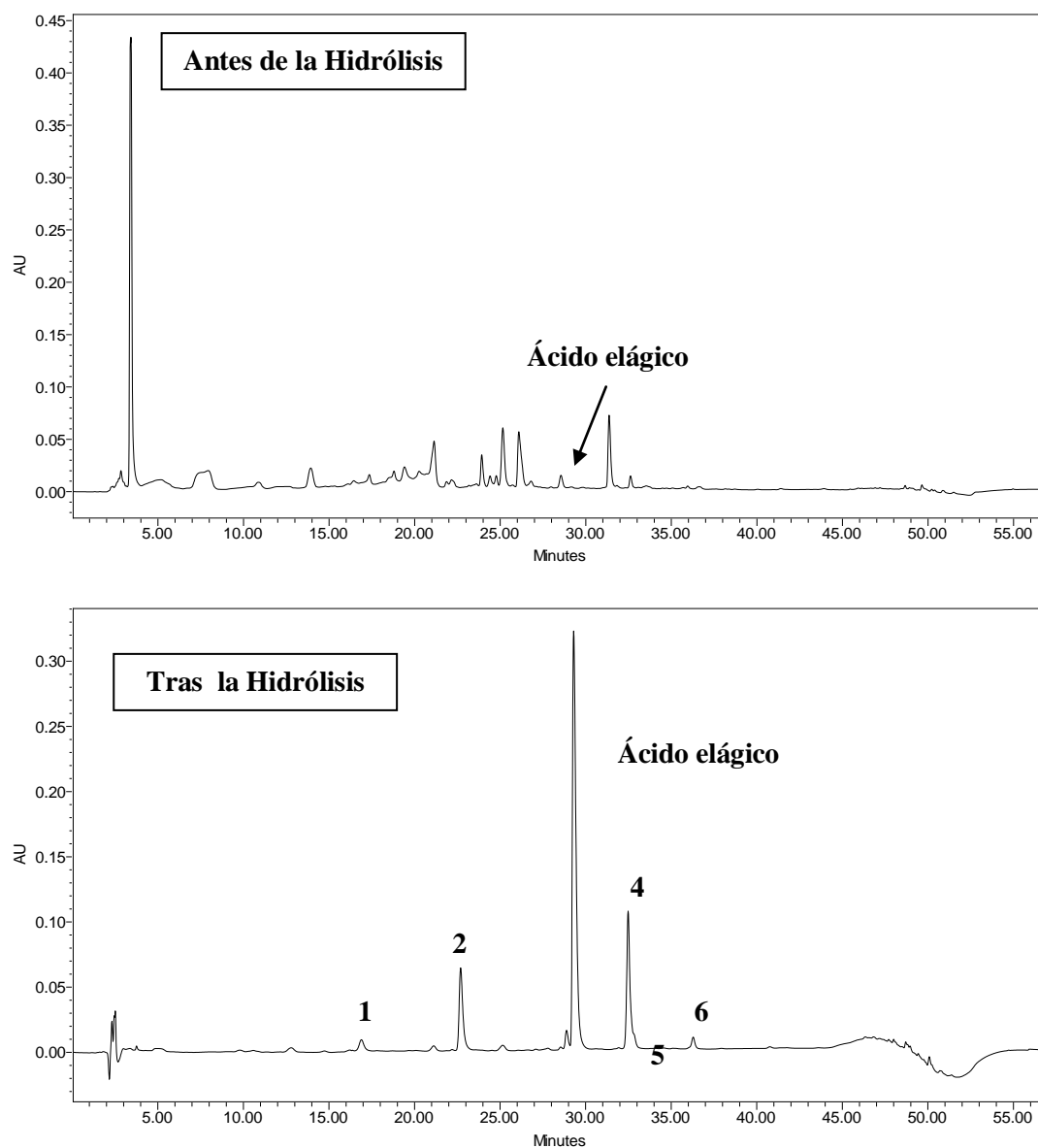
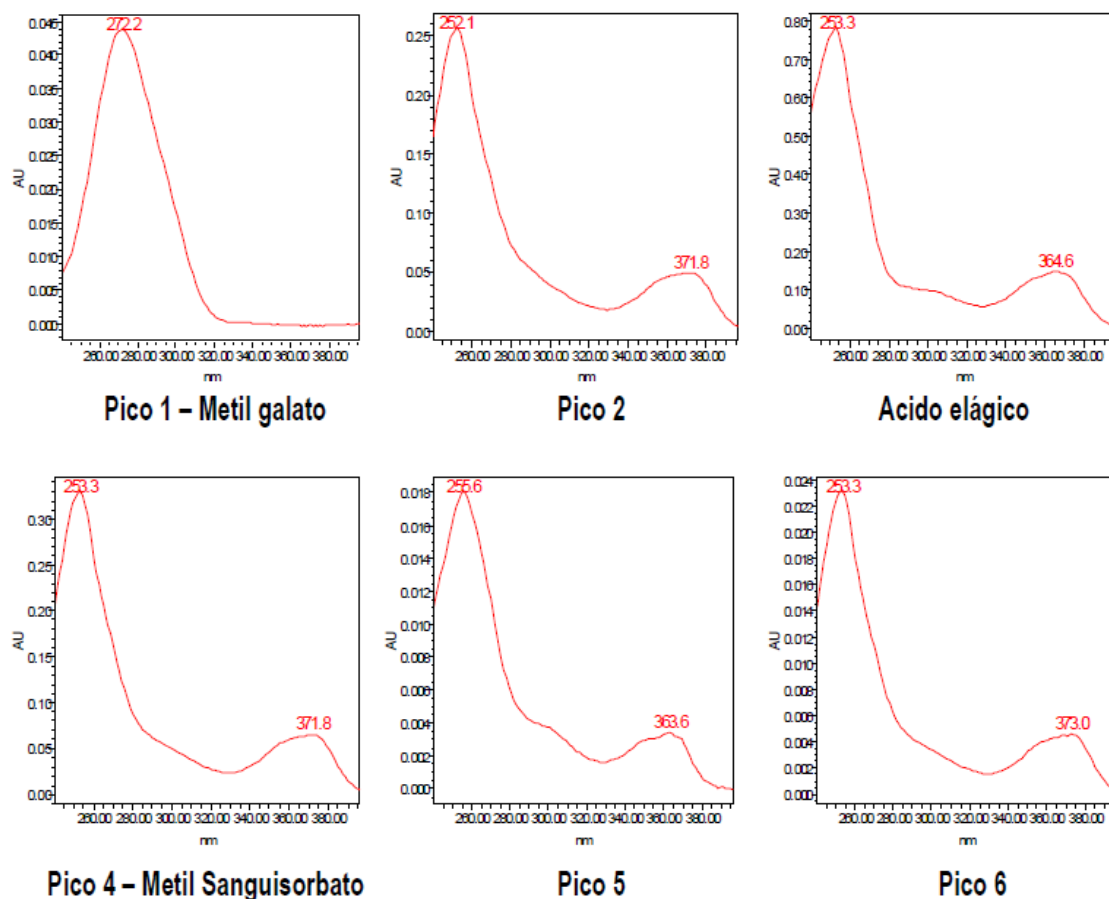


Figura 15: cromatogramas antes y tras la hidrólisis de elagitaninos de un vino de mora (254 nm)



**Figura 16:** espectros de absorción de los principales compuestos resultantes de la hidrólisis de los elagitaninos.

La cantidad tanto de ácido elágico libre se encuentra entre 4,8 y 18,2 mg/l y los elagitaninos totales entre 302,8 y 826,6 mg/l. Mientras que los elagitaninos totales obtenidos son similares a los del estudio anterior (304 a 837 mg/l), la cantidad de ácido elágico libre es muy inferior (33 a 108 mg/l).

En la tabla (17) se muestran los resultados de aplicar un ANOVA a los datos tanto de elagitaninos en general como del componente principal, el ácido elágico para los diferentes vinos de mora. Se han encontrado diferencias significativas entre los vinos para los dos componentes analizados, apreciándose en ambos casos un incremento de las concentraciones tanto del ácido elágico en particular como de los elagitaninos conforme aumenta la concentración de fruta.

**Tabla 17: Elagitaninos obtenidos mediante HPLC de los vinos de mora con las distintas proporciones (a1, a2, a3).**

	A1		A2		A3		p-valor
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
Elagitaninos	320 <sup>a</sup>	19	625 <sup>b</sup>	98	756 <sup>c</sup>	54	0,000
Ác elágico	6,3 <sup>a</sup>	2,1	16,5 <sup>b</sup>	2,5	12,5 <sup>b</sup>	4,0	0,003

### 5.3.2. Vinos de mezcla

Los vinos elaborados con mezcla de mora y manzana contenían concentraciones de ácido elágico libre y de elagitaninos totales que oscilan entre 2,7 y 15,0 mg/ L y 206 y 731 mg/L respectivamente. Ambas cantidades son similares a las obtenidas en los vinos de mora, por lo que la aportación de estos compuestos al vino parecen depender de la mora y no de la manzana que no ejerce ninguna influencia en cuanto a estos parámetros.

En el caso de los vinos de mezcla (tabla 18), la evolución de los elagitaninos sigue el mismo patrón que otros parámetros analizados, puesto que es el vino a2, el que tiene mayor concentración, aquel que contiene mayor concentración de elagitaninos y de ácido elágico.

**Tabla 18: Elagitaninos obtenidos mediante HPLC de los vinos de mezcla con las distintas proporciones (a1, a2, a3).**

	A1		A2		A3		p-valor
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
Elagitaninos	231 <sup>a</sup>	25	616 <sup>c</sup>	100	492 <sup>b</sup>	51	0,000
Ác elágico	3,4 <sup>a</sup>	0,6	7,1 <sup>b</sup>	2,6	7,6 <sup>c</sup>	4,3	0,001

## 5.4. Relación entre variables

### 5.4.1. Vinos de mora

Puesto que al final, la mayor parte de los parámetros estudiados tienen una procedencia común o alguna clase de punto de unión, se evaluó la existencia de correlaciones entre todos ellos para así determinar cuál es la relación existente y más concretamente la magnitud de esa similitud.

En la tabla 19 se muestran las correlaciones simples obtenidas entre los distintos parámetros estudiados en los vinos de mora.

Tabla 19: matriz de correlaciones de Pearson para los vinos de mora

	%Am	%R	%AZ	IC	T	WC	CD <sub>SO2</sub>	AC	CAW
%R	-0,982**								
%Az	0,942**	-0,989**							
IC	0,825**	-0,870**	0,883**						
T	0,989**	-0,991**	0,968**	0,852**					
WC	0,797**	-0,846**	0,863**	0,999**	0,825**				
CD <sub>SO2</sub>	0,860**	-0,898**	0,904**	0,981**	0,892**	0,973**			
AC	0,688*	-0,747**	0,774**	0,961**	0,710**	0,972**	0,891**		
CAW	0,940**	-0,968**	0,965**	0,909**	0,963**	0,889**	0,957**	0,772	
AT	-0,002	-0,027	0,049	0,383	0,005	0,413	0,239	0,566	0,006
CiGlu	0,032	-0,017	0,006	0,177	0,008	0,201	0,038	0,348	-0,073
CiRut	-0,639*	0,681*	-0,696*	-0,504	-0,665*	-0,476	-0,595**	-0,333	-0,707*
A_min1	0,737**	-0,728**	0,704*	0,779**	0,736**	0,777**	0,770**	0,737**	0,756**
A_min2	-0,178	0,241	-0,282	-0,210	-0,234	-0,198	-0,301	-0,088	-0,330
A_min3	0,751**	-0,803**	0,823**	0,878**	0,782**	0,878**	0,863**	0,843**	0,830**
AT <sub>HPLC</sub>	-0,381	0,419	-0,436	-0,235	-0,408	-0,208	-0,344	-0,064	-0,460
IPT	0,821**	-0,881**	0,905**	0,918**	0,843**	0,915**	0,898**	0,882**	0,890**
PT	0,821**	-0,867**	0,881**	0,914**	0,836**	0,911**	0,901**	0,871**	0,890**
AE	0,486	-0,619*	0,707*	0,595*	0,549	0,597*	0,566	0,595*	0,614*
EL	0,893**	-0,905**	0,893**	0,864**	0,898**	0,849**	0,888**	0,763**	0,921**
AA	0,882**	-0,900**	0,891**	0,893**	0,874**	0,885**	0,874**	0,846**	0,891**

	AT	CiGlu	CiRu	A_min1	A_min2	A_min3	AT <sub>HPLC</sub>	IPT	PT	AE	EL
CiGlu	0,571										
CiRu	0,349	0,653*									
A_min1	0,163	0,480	-0,110								
A_min2	0,290	0,777**	0,830**	0,280							
A_min3	0,233	0,330	-0,307	0,898**	0,037						
AT <sub>HPLC</sub>	0,441	0,846**	0,945**	0,197	0,912**	-0,008					
IPT	0,145	0,174	-0,555	0,794**	-0,219	0,905**	-0,270				
PT	0,118	0,230	-0,502	0,845**	-0,160	0,896**	-0,208	0,980**			
AE	0,090	0,022	-0,433	0,448	-0,134	0,675*	-0,251	0,690*	0,606*		
EL	-0,045	0,119	-0,574	0,845*	-0,195	0,890**	-0,290	0,939**	0,955**	0,533**	
AA	0,105	0,240	-0,513	0,846**	-0,107	0,866**	-0,213	0,966**	0,975**	0,581*	0,960**

Todos los parámetros relacionados directamente con el color (derivados de medidas espectrofotométricas) tienen una elevada correlación entre sí. Puesto que algunas están directamente relacionadas como las medidas de las tres medidas de absorbancia a 420, 520 y 620 nm, la intensidad colorante (IC) y la tonalidad (T) eran de esperar estos valores de correlación tan elevados.

También existe una elevada correlación entre estos parámetros y las variables  $CD_{SO_2}$ , AC y CAW. Mientras que no existe ninguna correlación entre las variables relacionadas con el color y el contenido de antocianos totales libres (AT).

Mediante las correlaciones también corroboramos la relación de los antocianos CiGlu, CiRu y min2 con su procedencia de la fruta puesto que se correlaciona positivamente con AC que representa a aquellos antocianos sensibles a la coloración y por tanto libres, mientras que se correlacionan negativamente con  $CD_{SO_2}$  y CAW que cuantifican aquellos pigmentos poliméricos y resistentes. De la misma manera, los antocianos que se piensa se han formado tras la fermentación y el almacenamiento de los vinos (min 1 y min 3) tienen un comportamiento opuesto a los anteriores que confirman su procedencia.

Un aspecto importante que analizar es la relación existente entre la actividad antioxidante (AA) y el resto de parámetros. Las correlaciones de mayor importancia son las que ligan AA con el contenido en polifenoles totales (PT), el índice de polifenoles totales (IPT), y el contenido en elagitaninos (EL). Además, estos tres parámetros se encuentran muy correlacionados entre sí. Por otro lado, sólo se aprecia correlación entre AA y las variables relacionadas con el contenido en antocianos en los dos grupos relacionados con antocianos poliméricos pero no libres, aunque en menor medida que la relación existente entre AA y los elagitaninos. Por lo tanto, la actividad antioxidante en los vinos de mora proviene en su mayoría de los elagitaninos al igual que fue observado por Urretavizcaya (2010).

#### 5.4.2. Vinos de mezcla

En cuanto a las mezclas las correlaciones de color son más evidentes en algún sentido puesto que se observa como las tonalidades rojas aumentan conforme aumenta el parámetro AC y disminuye con  $CD_{SO_2}$  y sobre todo con CAW mientras que con el amarillo y el azul ocurre lo contrario. En cuanto a los antocianos se observan las mismas correlaciones que en la mora con CiGlu, CiRu y min2 mientras que no hay correlaciones observables entre min1 y min3 con ninguno de los parámetros estudiados.

La actividad antioxidante en los vinos de mezcla se encuentra relacionada de manera más importante con el contenido en polifenoles totales (PT), el índice de polifenoles totales (IPT) y el contenido de elagitaninos , sin embargo, en esta ocasión no tiene correlación con el ácido elágico. Lo mismo se observó en el estudio realizado un año antes, donde se veía que la actividad antioxidante se debía a los elagitaninos totales pero no al ácido elágico libre ni a los antocianos.

**Tabla 20: matriz de correlaciones de Pearson para los vinos de mezcla**

	%Am	%R	%Az	IC	T	WC	CD <sub>SO2</sub>	AC	CAW
<b>%R</b>	-0,869**								
<b>%Az</b>	0,768**	-0,984**							
<b>IC</b>	-0,131	-0,024	0,77						
<b>T</b>	0,928**	-0,990**	0,951**	-0,039					
<b>WC</b>	-0,285	0,157	-0,102	0,983**	-0,216				
<b>CD<sub>SO2</sub></b>	0,333	-0,564	0,610*	0,822**	0,500	0,707*			
<b>AC</b>	-0,704*	0,734**	-0,699*	0,638*	-0,760**	0,766**	0,088		
<b>CAW</b>	0,758**	-0,965**	0,979**	0,180	0,933**	0,003	0,700*	-0,633*	
<b>AT</b>	-0,863**	0,942**	-0,911**	0,148	-0,948**	0,322	-0,423	0,838**	-0,892**
<b>CiGlu</b>	-0,887**	0,960**	-0,926**	-0,012	-0,965**	0,166	-0,552	0,737**	-0,925**
<b>CiRut</b>	-0,885**	0,978**	0,951**	-0,008	-0,977**	0,172	-0,552	0,744**	-0,938**
<b>A_min1</b>	0,308	-0,107	0,029	0,314	0,144	0,300	0,214	0,228	0,032
<b>A_min2</b>	-0,772**	0,977**	0,989**	-0,019	-0,946**	0,159	-0,566	0,739**	-0,965**
<b>A_min3</b>	0,435	-0,183	0,082	0,222	0,238	0,195	0,169	0,122	0,054
<b>AT<sub>HPLC</sub></b>	-0,873**	0,979**	-0,956**	0,000	-0,975**	0,181	-0,551	0,756**	-0,945**
<b>IPT</b>	0,086	-0,194	0,220	0,924**	0,157	0,875**	0,866**	0,446	0,344
<b>PT</b>	0,078	-0,183	0,209	0,937**	0,144	0,891**	0,854**	0,479	0,316
<b>AE</b>	-0,748**	0,821**	-0,796**	0,252	-0,831**	0,396	-0,260	0,795**	-0,770**
<b>EL</b>	-0,295	0,136	-0,071	0,951**	-0,202	0,960**	0,714**	0,703*	-0,030
<b>AA</b>	0,008	-0,074	0,099	0,936**	0,037	0,910**	0,783**	0,570	0,199

	AT	CiGlu	CiRu	A_min1	A_min2	A_min3	AT <sub>HPLC</sub>	IPT	PT	AE	EL
<b>CiGlu</b>	0,975**										
<b>CiRu</b>	0,970**	0,989**									
<b>A_min1</b>	0,000	-0,062	-0,056								
<b>A_min2</b>	0,921**	0,923**	0,958**	0,015							
<b>A_min3</b>	-0,118	-0,221	-0,234	0,576*	-0,059						
<b>AT<sub>HPLC</sub></b>	0,974**	0,990**	0,999**	-0,026	0,963**	-0,193					
<b>IPT</b>	-0,060	-0,229	-0,201	0,176	-0,159	0,230	-0,197				
<b>PT</b>	-0,030	-0,201	-0,180	0,223	-0,142	0,284	-0,172	0,981**			
<b>AE</b>	0,798**	0,775**	0,833**	0,209	0,853**	-0,038	0,836**	0,063	0,110		
<b>EL</b>	0,249	0,104	0,140	0,248	0,141	0,087	0,142	0,864*	0,878**	0,459	
<b>AA</b>	0,073	-0,088	-0,070	0,275	-0,029	0,348	-0,059	0,932**	0,977**	0,238	0,887**



## **6. CONCLUSIONES**

1. El componente del color predominante en todos los vinos fue el rojo, incluso en aquellos donde la manzana era la materia prima mayoritaria. Al incrementar la cantidad de fruta, se observó un incremento en la intensidad de color así como una mayor evolución del mismo (tonalidad más amarilla, mayor edad química). Este efecto fue más acusado en el caso de los vinos de mezcla debida, probablemente a la influencia de la manzana.
2. El contenido en polifenoles totales de los vinos de mora osciló entre 602 y 1217 mg/l. Los elagitaninos fueron los compuestos fenólicos mayoritarios con valores entre 303 y 827 mg/l y la concentración en antocianos determinada mediante HPLC varió entre 39,1 y 84,8 mg/l.
3. El contenido en polifenoles totales de los vinos de mezcla osciló entre 861 y 1506 mg/l. Los elagitaninos fueron los compuestos fenólicos mayoritarios con valores entre 206 y 731 mg/l y la concentración en antocianos determinada mediante HPLC varió entre 16,1 y 91,6 mg/l.
4. La actividad antioxidante osciló entre 3,82 y 9,21 milimoles trolox/ l en los vinos de mora y entre 5,17 y 9,81 milimoles trolox/ l en el caso de los vinos de mezcla.
5. El análisis antociánico de los vinos mediante HPLC permitió corroborar la presencia de dos picos principales en los vinos, el rutinósido de cianicina como compuesto mayoritario (68% del total) y el glucósido de cianidina (18% del total). Además se detectaron 15 picos adicionales que se distribuyeron en tres grupos: A\_min1 que representa a dos pigmentos con tonalidad anaranjada y, por lo tanto, derivados antociánicos generados en la fermentación y conservación del vino, A\_min2 donde se encuentran los antocianos que probablemente están vinculados a la pelargonidina y procedan de la fruta; y A\_min3 formado por el resto de picos que, al igual que los pigmentos del grupo A\_min1, parecen haber surgido durante la elaboración y el almacenamiento del vino.

6. Tanto en los vinos elaborados con mora, como en los elaborados mediante la mezcla de mora y manzana se observó un aumento de los polifenoles totales, los elagitaninos y de la capacidad antioxidante con el aumento de la proporción de fruta en los vinos.
7. El aumento de la concentración de mora en los vinos favoreció también la presencia de compuestos antocianos tanto libres como de sus pigmentos derivados.
8. Existe una elevada correlación entre la actividad antioxidante, las variables relacionadas con el contenido polifenólico y el contenido en elagitaninos. A pesar de existir una pequeña relación de los antocianos derivados con la actividad antioxidante de los vinos de mora, es menor comparada con la importante relación existente con los elagitaninos, por lo que son los elagitaninos los principales polifenoles responsables de esta propiedad en los vinos de mora. En los vinos de mezcla no se observó esta relación entre actividad antioxidante y antocianos, pero si entre polifenoles totales, elagitaninos y la actividad antioxidante.
9. Las correlaciones observadas entre la composición antociánica y los parámetros relacionados con el color, nos permitieron reforzar la idea del diferente origen de los distintos grupos de antocianos. De este modo, CiGlu, CiRu y A<sub>min2</sub> se correlacionan positivamente con AC y negativamente con CDR<sub>SO2</sub> y CAW confirmando su procedencia de la fruta, mientras que A<sub>min1</sub> y A<sub>min3</sub> tienen un comportamiento opuesto a los anteriores por lo que pueden proceder del proceso de elaboración de los vinos.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

### 7.1.Artículos

- Castillo, N., Fernández, M., Gómez, S., García, E., Hermosín, I. Color Related Phenolic Composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) Grapes and Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 7883–7891.
- Farinnango, M.E. Estudios de la fisiología postcosecha de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) y de la variedad Brazos (*Rubus* sp.). Proyecto previo a la obtención del título de Ingeniería Agroforestal. Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Quito, 2010.
- Ferreyra, M. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos. Estudio del proceso biotecnológico para la elaboración de una bebida alcohólica a partir de jugo de naranjas, Valencia, 2006.
- Flanzy, C. Enología :fundamentos científicos y tecnológicos, Ed Mundi- Prensa, 2ª Ed., 2003.
- Garzón G.A.; Riedl K.M.; Schwartz S.J. Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andes berry (*Rubus glaucus* Benth). *J. Food Sci.* 2009, 74, 227-232.
- Howard, L., Hager, J. Berry fruit phytochemicals in berry fruit. Ed. Y. Zap. CRC Press, Florida, USA. 2007.P-73-104.
- Khanizadeh, S., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Charles, M. T., Rupasinghe, V. H. P., 2008. Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 396–401.
- Koca, I., Karadeniz, B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the black sea region of Turkey, *Scientia Horticulturales*. 2009 vol.121, p. 447-450.
- Marks, C, Mullen, W., Crozier, A., 2007. Flavonoid and Hydroxycinnamate Profiles of English Apple Ciders . *J. Agric. Food Chem.* 55, 8723–8730.
- Mertz C.; Cheynier V.; Günata Z.; Brat P. Analysis of phenolic compounds of two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 8616-8624.

- Mertz C.; Gancel A.L.; Günata Z.; Alter P.; Dhuique-Mayer C.; Vaillant F.; Perez A.M.; Ruales J.; Brat P. Phenolic compounds and antioxidant activity of three tropical fruits. *J. Food Comp. Anal.* 2009, 22, 381-387.
- Montoya, A., Londoño, J.K., Márquez, C. Licor de mora de castilla (*Rubus glaucus benth*) con diferentes porcentajes de pulpa. *Revista Facultad Nacional de Agronomía* vol. 58, núm. 2, julio-diciembre, 2005, pp. 2963-2973.
- National Research Council, Lost Crops of Incas: Little- Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. National Academies Press online, 1989.
- Ramos F.A.; Delgado J.L.; Bautista E.; Morales A.L.; Duque C. Changes in volatiles with the application of progressive freeze-concentration to Andes berry (*Rubus glaucus* Benth). *J. Food Eng.* 2005, 69, 291–297.
- Recalde, D.E. Elaboración de una bebida alcohólica de Jíjama (*Smallanthus sonchifolius*) y Manzana (*Pyrus malus* L). Proyecto previo a la obtención del título de Ingeniería Agroforestal. Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Quito, 2010.
- Rommel A.; Heatherbell D.A.; Wrolstad R.E. Red raspberry juice and wine: effect of processing and storage on anthocyanin pigment composition, color and appearance. *J. Food Sci.* 1990, 55, 1011-1017.
- Sánchez-Moreno C., Cao G., Ou B., Prior R.L. Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen Radical Absorbance capacity comparisons with non-traditional wines obtained from highbush blueberry. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 4889-4896.
- Sánchez-Moreno C., Cao G., Ou B., Prior R.L. Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen Radical Absorbance capacity comparisons with non-traditional wines obtained from highbush blueberry. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 4889-4896.
- Schreckinger M.E.; Lotton J.; Lila M.A.; Gonzalez de Mejia E. Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential and commercialization. *J. Med. Food* 2010, 233-246.
- Su M-S; Chien P-J. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Food Chem.* 2007, 104, 182-187.

- Sun, J., Chu, Y. F., Wu, X., Liu, R. H. ,2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7449–7454.
- Urretavizcaya, I. Caracterización del color, la composición fenólica y la actividad antioxidante de vinos de mora andina (*Rubus glaucus*) de Ecuador. Memoria de investigación presentada para optar a la superación de la prueba de suficiencia investigadora en el programa de doctorado. Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, 2010.
- Vasco C.; Riñen K.; Ruales J.; Kamal-Eldin A. Phenolic compounds in *Rosaceae* fruits from Ecuador. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 1204-1212.
- Vasco C.; Ruales J.; Kamal-Eldin A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits of Ecuador. *Food Chem.* 2008, 111, 816-823.
- Vrhovsek U.; Palchetti A.; Reniero F.; Guillou C.; Masuero D.; Mattivi F. Concentration and mean degree of polymerization of *Rubus* ellagitannins evaluated by optimized acid methanolysis. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 4469-4475.
- Vrhovsek, U., Ciongo, L., Mattivi, F., A., Viola, R. A survey of ellagitannin content in raspberry and blackberry cultivars grown in Trentino (Italy), *Eur food Res Technol*, 2008, vol 226 p 817-824.
- Wu X.; Prior R.L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 2589-2599.

## 7.2. Páginas Web

- Agencia de Noticias para la Difusión de la Ciencia y Tecnología del Instituto ECYT de la Universidad de Salamanca (DiCYT):  
<http://www.dicyt.com/noticias/nuevas-tecnologias-para-el-cultivo-de-mora>
- Bodega Cair O' Mohr (Escocia): <http://cairnomohr.homestead.com/>
- Bodega Chateau Renaissance (NY, E.E.U.U.):  
<http://www.winesparkle.com/fruitwines.html>
- Organisation Internationale de La Vigne et du Vin (OIV): <http://www.oiv.int/>
- Página oficial Tuncuracua: <http://www.codeso.com/TurismoTungurahua.html>.

## **8. ANEXOS**



## ANEXO A1: Tablas de datos de los vinos experimentales

### - Vinos de mora

Tabla 21: Parámetros de color ( $A_{420}$ ,  $A_{520}$ ,  $A_{620}$ , IC y T) de los vinos de mora

Muestra	$A_{420}$	$A_{520}$	$A_{620}$	IC	T
A1.1	0,90	1,70	0,08	2,68	0,53
A1.2	1,03	1,93	0,11	3,06	0,54
A1.3	0,91	1,77	0,08	2,76	0,52
A1.4	0,94	1,81	0,08	2,83	0,52
A2.1	1,84	3,10	0,31	5,25	0,59
A2.2	1,43	2,50	0,21	4,14	0,57
A2.3	1,52	2,51	0,25	4,28	0,61
A2.4	1,73	3,08	0,24	5,05	0,56
A3.1	1,89	3,23	0,28	5,40	0,58
A3.2	2,44	4,10	0,42	6,96	0,60
A3.3	2,34	3,71	0,40	6,45	0,63
A3.4	2,15	3,65	0,33	6,13	0,59

Tabla A1.2: Parámetros de color (WC,  $CD_{S02}$ , AC, CAW) de los vinos de mora.

Muestra	WC	$CD_{S02}$	AC	CAW (%)
A1.1	1,70	0,33	1,37	19,2
A1.2	1,93	0,33	1,59	17,2
A1.3	1,77	0,29	1,48	16,2
A1.4	1,81	0,29	1,52	16,3
A2.1	3,10	0,99	2,11	31,9
A2.2	2,50	0,65	1,85	26,0
A2.3	2,51	0,85	1,66	33,7
A2.4	3,08	0,72	2,36	23,4
A3.1	3,23	0,97	2,26	30,1
A3.2	4,10	1,54	2,56	37,5
A3.3	3,71	1,35	2,36	36,4
A3.4	3,65	1,22	2,43	33,4

Tabla 22: Composición fenólica (AT, PT, IPT) y actividad antioxidante (AA) de los vinos de mora.

Muestra	AT	PT	IPT	AA
A1.1	48,5	602	18,3	4,22
A1.2	58,6	689	20,8	4,23
A1.3	50,1	647	18,4	3,82
A1.4	51,3	604	21,0	3,99
A2.1	55,4	941	34,9	6,72
A2.2	43,9	1057	38,7	7,80
A2.3	35,7	970	35,6	7,60
A2.4	71,0	919	35,3	7,19
A3.1	51,4	1194	40,0	9,21
A3.2	57,8	1217	44,5	8,38
A3.3	59,3	1099	38,5	8,96
A3.4	57,9	1181	43,6	8,79

Tabla 23: Contenido en antocianos mediante HPLC de los vinos de mora (mg/l)

Muestra	Ci_Glu	Ci_Ru	A_min1	A_min2	A_min3	A_tot
A1.1	9,3	45,4	2,4	5,8	6,1	69,7
A1.2	14,8	51,0	2,2	5,7	6,2	80,7
A1.3	10,7	50,3	2,2	6,0	5,9	76,0
A1.4	6,4	28,7	0,8	3,1	4,9	44,0
A2.1	7,0	19,4	2,0	3,8	7,0	39,1
A2.2	11,3	33,8	2,9	5,2	8,1	62,2
A2.3	8,4	22,9	3,1	4,5	7,7	47,3
A2.4	16,3	49,7	3,1	6,6	8,2	84,8
A3.1	13,6	33,4	3,4	5,2	7,6	64,2
A3.2	10,1	27,4	3,7	4,0	9,8	55,7
A3.3	11,5	28,4	3,6	5,1	8,3	57,6
A3.4	11,8	34,2	3,7	4,7	8,3	63,5

Tabla A1.5: Contenido en elagitaninos (EL) y ácido elágico (AE) de los vinos de mora (mg/l)

Muestra	AE	EL
A1.1	4,8	343
A1.2	5,0	328
A1.3	9,3	303
A1.4	5,9	307
A2.1	18,0	542
A2.2	12,7	705
A2.3	17,1	715
A2.4	18,2	537
A3.1	12,6	727
A3.2	17,9	827
A3.3	8,2	766
A3.4	11,6	704

- Vinos de mezcla

Tabla A1.6: Parámetros de color ( $A_{420}$ ,  $A_{520}$ ,  $A_{620}$ , IC y T) de los vinos de mezcla

Muestra	$A_{420}$	$A_{520}$	$A_{620}$	IC	T
A1.1	0,81	1,23	0,23	2,27	0,66
A1.2	0,90	1,39	0,21	2,50	0,65
A1.3	0,79	1,24	0,16	2,19	0,63
A1.4	0,90	1,34	0,26	2,49	0,67
A2.1	1,80	2,84	0,51	5,15	0,63
A2.2	1,43	2,30	0,24	3,96	0,62
A2.3	1,76	2,71	0,46	4,92	0,65
A2.4	1,72	2,69	0,43	4,84	0,64
A3.1	1,00	1,90	0,10	2,99	0,53
A3.2	1,20	2,21	0,15	3,55	0,54
A3.3	1,28	2,28	0,18	3,73	0,56
A3.4	1,24	2,10	0,19	3,52	0,59

Tabla A1.7: Parámetros de color (WC, CD<sub>SO2</sub>, AC, CAW) de los vinos de mezcla

Muestra	WC	CD <sub>SO2</sub>	AC	CAW (%)
A1.1	1,23	0,61	0,62	49,5
A1.2	1,39	0,53	0,85	38,5
A1.3	1,24	0,46	0,78	37,3
A1.4	1,34	0,70	0,64	52,0
A2.1	2,84	1,38	1,47	48,4
A2.2	2,30	0,79	1,51	34,2
A2.3	2,71	1,33	1,38	49,2
A2.4	2,69	1,38	1,31	51,3
A3.1	1,90	0,34	1,55	18,1
A3.2	2,21	0,46	1,74	21,0
A3.3	2,28	0,51	1,76	22,6
A3.4	2,10	0,56	1,54	26,6

Tabla 24: Composición fenólica (AT, PT, IPT) y actividad antioxidante (AA) de los vinos de mezcla.

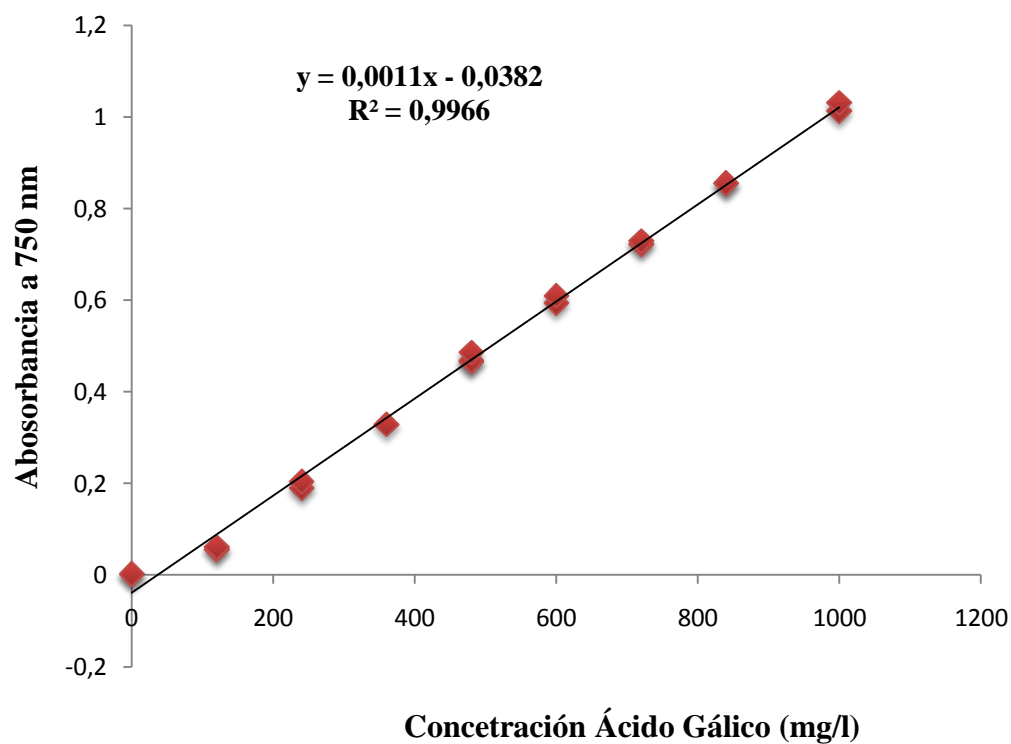
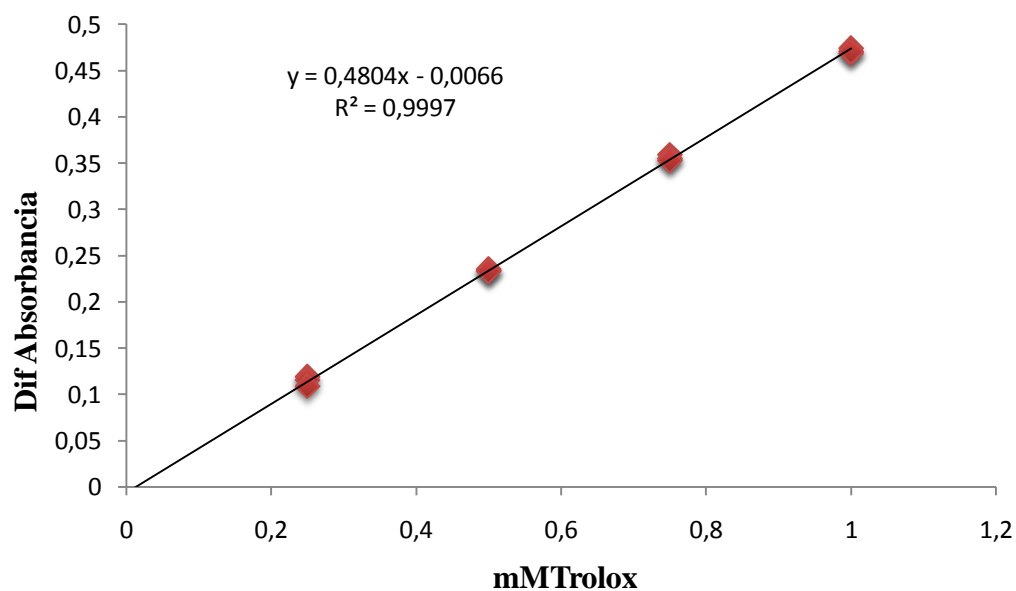
Muestra	AT	PT	IPT	AA
A1.1	17,6	888	24,0	5,17
A1.2	16,3	988	28,9	5,85
A1.3	15,6	862	23,6	5,31
A1.4	10,8	1006	30,7	5,93
A2.1	22,6	1461	45,1	9,81
A2.2	36,3	1382	42,8	9,30
A2.3	24,6	1506	48,4	9,30
A2.4	19,4	1355	46,4	8,45
A3.1	54,4	1039	30,5	6,69
A3.2	63,4	1074	34,0	6,53
A3.3	59,7	1055	28,6	7,24
A3.4	43,1	1077	32,8	6,69

Tabla 25: contenido en antocianos mediante HPLC de los vinos de mezcla (mg/l)

Muestra	Ci_Glu	Ci_Ru	A_min1	A_min2	A_min3	A_tot
A1.1	1,5	3,3	1,6	2,7	7,0	16,9
A1.2	1,8	5,4	1,7	3,6	8,0	21,5
A1.3	2,6	6,9	1,7	3,6	7,7	23,4
A1.4	1,3	2,9	1,6	2,7	6,8	16,1
A2.1	2,1	6,1	1,8	3,1	8,1	22,0
A2.2	5,1	23,7	2,0	5,1	9,0	45,6
A2.3	2,1	6,1	1,8	3,1	7,0	21,0
A2.4	1,6	5,6	1,9	3,3	7,4	20,6
A3.1	13,2	64,0	1,1	6,6	6,0	91,6
A3.2	13,8	56,9	1,2	5,8	7,3	85,0
A3.3	14,5	57,4	2,3	5,7	7,6	87,6
A3.4	8,1	40,0	2,7	5,6	7,9	65,1

Tabla 26: Contenido en elagitaninos (EL) y ácido elágico (AE) de los vinos de mezcla (mg/l)

Muestra	AE	EL
A1.1	2,68	215
A1.2	3,25	262
A1.3	4,24	206
A1.4	3,58	241
A2.1	9,68	731
A2.2	9,02	487
A2.3	4,59	630
A2.4	5,06	614
A3.1	14,98	533
A3.2	9,08	435
A3.3	11,40	456
A3.4	13,92	538

**ANEXO A2: Rectas patrón****Figura A2.1: recta patrón ácido gálico****Figura A2.2: Recta patrón DPPH**

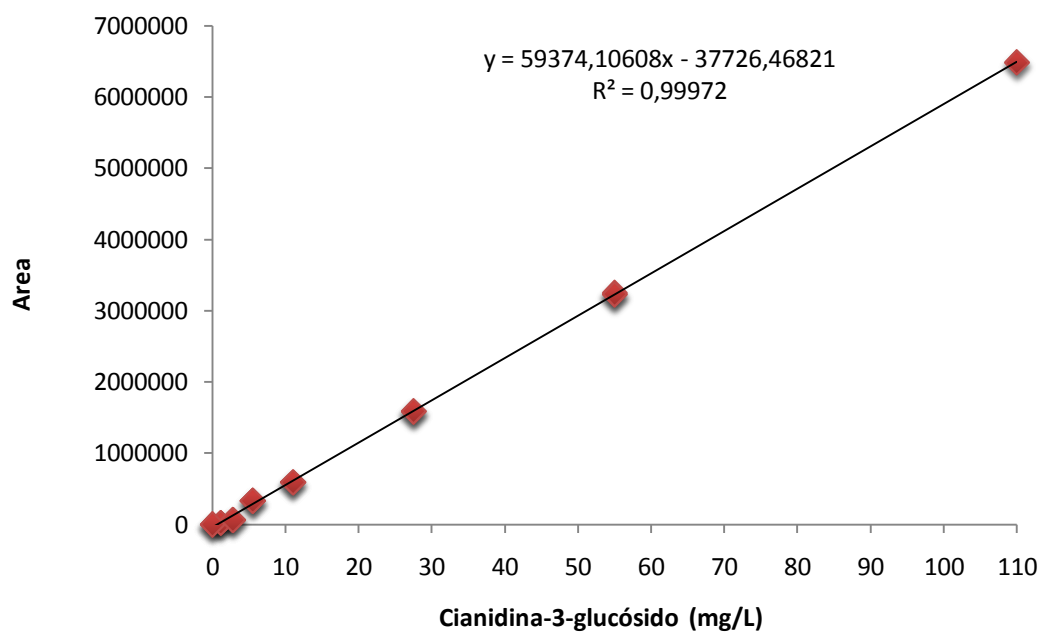


Figura A2.3: Recta patrón del monoglucósido de cianidina

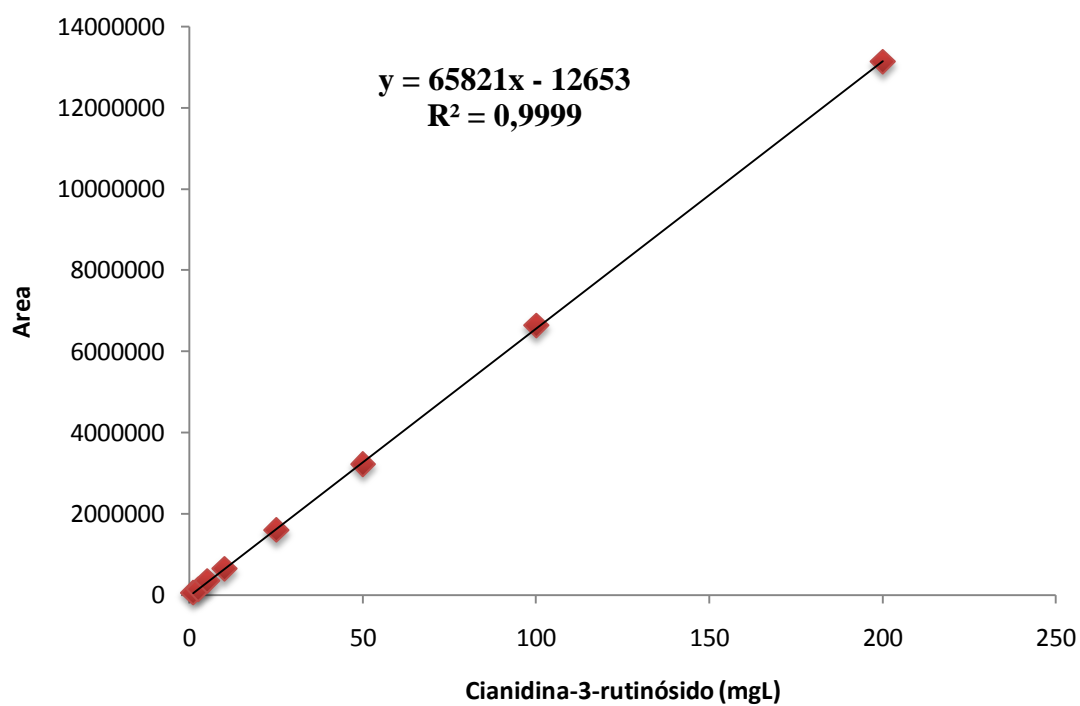


Figura A2.4: Recta patrón del rutinósido de cianidina

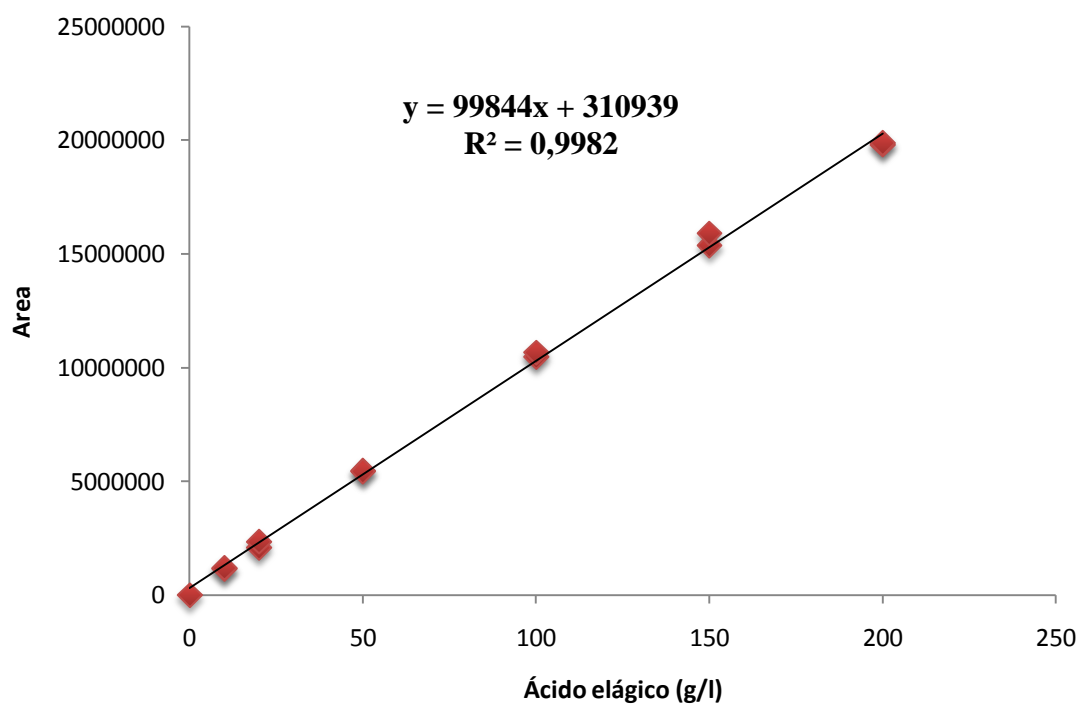


Figura A2.5: Recta patrón del ácido elágico

### ANEXO A3: Tablas de correlación entre picos de antocianos



**Tabla A3.1: CORRELACIONES ENTRE LOS PICOS ANTOCIANOS VINOS DE MORA**

	Ci_Glu	Ci_Ru	3	4	5	6	7	8	9-10	11-12	13	14	16	17
Ci_Ru	0,653*													
3	0,022	-0,634*												
4	0,488	-0,087	0,870**											
5	0,773**	0,784**	-0,447	0,125										
6	0,272	-0,256	0,667*	0,733**	-0,092									
7	0,267	-0,237	0,663*	0,752**	-0,085	0,805**								
8	0,313	-0,305	0,830**	0,800**	-0,017	0,844**	0,860**							
9-10	0,083	-0,516	0,835**	0,759**	-0,252	0,839**	0,867**	0,921**						
11-12	-0,016	-0,608*	0,880**	0,809**	-0,402	0,774**	0,899**	0,922**	0,971**					
13	0,506	-0,183	0,920**	0,946**	0,122	0,720**	0,703**	0,865**	0,802**	0,835**				
14	0,296	-0,402	0,955**	0,873**	-0,076	0,754*	0,668*	0,847**	0,874**	0,875**	0,954**			
16	0,453	0,223	-0,118	-0,055	0,143	-0,178	-0,171	-0,279	-0,289	-0,268	-0,003	-0,019		
17	0,555	0,625*	-0,240	0,498	0,505	0,137	0,083	-0,007	-0,047	-0,351	0,319	0,193	0,460	
18	0,331	0,617*	-0,561	0,232	0,497	-0,090	-0,207	-0,256	-0,264	-0,668*	0,060	-0,026	0,130	0,915**

**Tabla A3.2: CORRELACIONES PICOS ANTOCIANOS VINOS DE MEZCLA**

	Ci_Glu	Ci_Ru	3	4	5	6	7	8	9-10	11-12	13	14	16	17
Ci_Ru	0,989**													
3	0,911**	0,943**												
4	0,599*	0,649*	0,844**											
5	0,922**	0,956**	0,894**	0,668*										
6	0,819**	0,806**	0,924**	0,725**	0,780**									
7	-0,672**	-0,675*	-0,505	-0,291	-0,620*	-0,749**								
8	0,507	0,436	0,540	0,309	0,482	0,563	-0,133							
9-10	-0,567	-0,601*	-0,295	-0,076	-0,621*	-0,509	0,865**	0,019						
11-12	-0,768**	-0,764**	-0,531	-0,279	-0,696*	-0,751**	0,977**	-0,205	0,875**					
13	-0,152	-0,106	0,226	0,393	0,018	-0,121	0,658*	0,161	0,559	0,622*				
14	0,586	0,619	0,658	0,754*	0,744*	0,660*	-0,246	0,589	-0,099	-0,282	0,345			
16	-0,451	-0,467	-0,062	-0,251	-0,359	-0,156	0,303	0,454	0,417	0,393	0,075	0,180		
17	0,311	0,326	0,209	0,447	0,246	-0,012	0,376	0,070	0,386	0,260	0,584*	0,368	-0,165	
18	0,546	0,575	0,493	0,695*	0,532	0,312	0,124	0,212	0,142	0,006	0,600*	0,574	-0,379	0,908**